



TESE DE DOUTORAMENTO

**OPTIMIZACIÓN DE UN SISTEMA
INTEGRADO ANAEROBIO Y
BIORREACTOR DE MEMBRANA, CON
BAJA HUELLA AMBIENTAL, PARA EL
TRATAMIENTO DE AGUAS
RESIDUALES DE BAJA CARGA**

Adrián Arias Baño

ESCOLA DE DOUTORAMENTO INTERNACIONAL DA
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA
PROGRAMA DE DOUTORAMENTO EN ENXEÑARÍA
QUÍMICA E AMBIENTAL

SANTIAGO DE COMPOSTELA

2021



DECLARACIÓN DO AUTOR/A DA TESE

OPTIMIZACIÓN DE UN SISTEMA INTEGRADO ANAEROBIO Y BIORREACTOR DE MEMBRANA, CON BAJA HUELLA AMBIENTAL, PARA EL TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALS DE BAJA CARGA

D. Adrián Arias Baño

Presento a miña tese, seguindo o procedemento axeitado ao Regulamento, e declaro que:

- 1) A tese abarca os resultados da elaboración do meu traballo.
- 2) De selo caso, na tese faise referencia ás colaboracións que tivo este traballo.
- 3) Confirmo que a tese non incorre en ningún tipo de plaxio doutros autores nin de traballos presentados por min para a obtención doutros títulos.
- 4) A tese é a versión definitiva presentada para a súa defensa e coincide coa versión enviada en formato electrónico.

En, ... de de 20..





AUTORIZACIÓN DO DIRECTOR DA TESE

OPTIMIZACIÓN DE UN SISTEMA INTEGRADO ANAEROBIO Y BIORREACTOR DE MEMBRANA, CON BAJA HUELLA AMBIENTAL, PARA EL TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALS DE BAJA CARGA

D. Juan Manuel Garrido Fernández

INFORMA:

Que a presente tese, correspóndese co traballo realizado por D. Adrián Arias Baño, baixo a miña dirección, e autorizo a súa presentación, considerando que reúne os requisitos esixidos no Regulamento de Estudos de Doutoramento da USC, e que como director desta non incorre nas causas de abstención establecidas na Lei 40/2015.

De acordo co indicado no Regulamento de Estudos de Doutoramento, declara tamén que a presente tese de doutoramento é idónea para ser defendida en base á modalidade de Monográfica con reprodución de publicacións, nos que a participación do/a doutorando/a foi decisiva para a súa elaboración e as publicacións se axustan ao Plan de Investigación.

En, ... de de 20..



AGRADECIMIENTOS

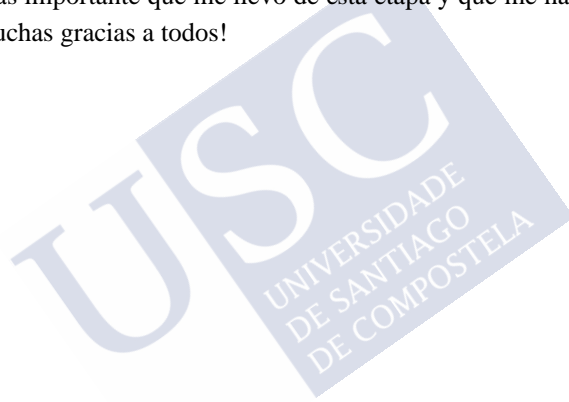
Me gustaría comenzar agradeciendo a uno de los principales culpables de que comenzase a desarrollar mi carrera predoctoral, al proyecto europeo LIFE SIAMEC, LIFE14 ENV/ES/000849, el brindarme la oportunidad de participar en el desarrollo de procesos innovadores de tratamientos de aguas residuales respetuosos con el medioambiente y financiar esta etapa predoctoral. Se trata de un proyecto de carácter demostrativo, en el que trabajé en torno a 3 años. Una de las dos plantas piloto demostrativas de la tecnología SIAM operadas en este proyecto forma parte de esta tesis doctoral. Además, tengo que agradecer la colaboración de cada uno de los socios del proyecto que han contribuido a la generación de conocimiento, tanto a nivel de proyecto como personal: Corporación Alimentaria Peñasanta S.A. (en cuyas instalaciones se ubicó el prototipo que forma parte de esta tesis), donde trabajé con Alba, Iría y Estefanía; Empresa Municipal de Aguas y Saneamiento de Murcia, S.A., donde compartí experiencias con Natividad; Entidad Regional de Saneamiento y Depuración de Aguas Residuales de la Región de Murcia, con Carlos y Pedro como responsables de las acciones desarrolladas por este socio; HIDROGEA, operador de la estación depuradora de Cartagena donde se ubicó el otro prototipo demostrativo de la tecnología SIAM, donde trabajé con Jorge, Ernesto y Teresa; CETAQUA, como entidad coordinadora del proyecto, donde Leticia y Álvaro eran los encargados del hacer Tetris con cada una de las tareas que conformaban del proyecto; y por supuesto la Universidade de Santiago de Compostela desde la cual participé en este proyecto junto a mi director y tutor de tesis Juan M. Garrido. También durante parte de mi etapa predoctoral desarrollé tareas en los 3 capítulos de operación restantes enmarcadas en el proyecto nacional COMETT (CTQ2016-80847-R), el cual también financió parte de mi etapa predoctoral.

La otra figura que comparte la carga de culpabilidad de que comenzase y ahora termine mi etapa de predoctoral es mi director Juan Garrido. Muchas gracias por haber confiado en mí para desarrollar estos proyectos de investigación, mis aptitudes técnicas se han desarrollado exponencialmente. Además, has sido un pilar

fundamental para poder terminar esta etapa, tanto por tu apoyo técnico como emocional.

Quiero dedicar unas palabras a mis compañeros del Biogroup. Han sido unos años fantásticos que no olvidaré, con grandes amigos y gente con la que mantuve lazos muy cercanos, una gran familia. No voy a poner nombres, pues esas personas saben muy bien que las llevo en mi corazón, tanto compañeros como profesores y personal técnico de apoyo.

Por último, quiero mostrar mi mayor agradecimiento para toda mi familia, especialmente a mis padres, mi tía y mi abuelo, por ayudarme a llegar a este punto y por estar siempre los fines de semana para desconectar. Y no puedo olvidarme de mi pareja, que es lo más importante que me llevo de esta etapa y que me ha apoyado en todo momento. ¡Muchas gracias a todos!



ÍNDICE DE CONTENIDOS

ABREVIACIONES	i
RESUMEN	v
RESUMO	xv
OBJETIVOS	xxv

1. INTRODUCCIÓN

1.1 TRATAMIENTO ANAEROBIO DE AGUAS RESIDUALES	1
1.1.1 Tratamientos anaerobios para aguas residuales de baja carga	1
1.1.2 Sistemas de manto de lodo anaerobio de flujo ascendente (UASB) para el tratamiento de aguas residuales domésticas	2
1.1.3 Ventajas de los sistemas UASB frente a procesos aerobios.....	3
1.1.4 Desventajas de los sistemas UASB frente a procesos aerobios	6
1.2 ALTERNATIVAS PARA EL POSTRATAMIENTO DE EFLUENTES DE SISTEMAS UASB.....	8
1.3 ELIMINACIÓN DE NITRÓGENO	13
1.4 ELIMINACIÓN DE FÓSFORO	16
1.5 ELIMINACIÓN CONJUNTA DE METANO Y NITRÓGENO	16
1.6 BIBLIOGRAFÍA	20

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 FASE LÍQUIDA	33
2.1.1 Demanda Química de Oxígeno (DQO)	33
2.1.2 Carbono Orgánico Disuelto Total (DOC)	35
2.1.3 Ácidos Grasos Volátiles (AGVs).....	36
2.1.4 Metano disuelto	36
2.1.5 Aniones y cationes.....	37

2.1.6 Compuestos de nitrógeno	38
2.1.7 pH	41
2.1.8 Potencial de oxidación-reducción (ORP).....	41
2.1.9 Oxígeno disuelto (OD) y temperatura.....	41
2.1.10 Compuestos de fósforo	41
2.1.11 Microcontaminantes	43
2.2 FASE SÓLIDA.....	45
2.2.1 Sólidos en suspensión totales y volátiles del licor de mezcla (SSTLM y SSVLM).....	45
2.3 FASE GAS.....	46
2.3.1 Caudal del gas generado.....	46
2.3.2 Composición del gas	47
2.4 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS	47
2.4.1 Identificación de poblaciones por FISH.....	47
2.4.2 Determinación de diversidad microbiana mediante secuenciación de genes	52
2.5 BIBLIOGRAFÍA.....	52
3. ELIMINACIÓN DE MACRO Y MICROCONTAMINANTES DE AGUAS RESIDUALES, MEDIANTE EL SISTEMA INTEGRADO SIAL, FORMADO POR REACTOR UASB Y POSTRATAMIENTO IFAS	
3.1 INTRODUCCIÓN	61
3.2 MATERIALES Y MÉTODOS	65
3.2.1 Equipo experimental	65
3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	68
3.3.1 Resultados generales en el sistema UASB	68
3.3.2 Eliminación de metano y nitrógeno en el postratamiento IFAS.....	69
3.3.3 Análisis microbiológicos	73

3.3.4 Eliminación de microcontaminantes orgánicos	75
3.4 CONCLUSIONES	81
3.5 BIBLIOGRAFÍA	82
 4. IMPACTO DE LOS IONES DE AZUFRE EN LA EFICACIA DE ELIMINACIÓN DE METANO DISUELTO, NITRÓGENO TOTAL Y MICROCONTAMINANTES MEDIANTE LA TECNOLOGÍA SIAM	
4.1 INTRODUCCIÓN	93
4.2 OPERACIÓN Y CONFIGURACIÓN DEL REACTOR.....	96
4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	98
4.3.1 Resultados generales.....	98
4.3.2 Eliminación de metano disuelto	100
4.3.3 Impacto del sulfuro de hidrógeno en la eliminación de nitrógeno	102
4.3.4 Eliminación de microcontaminantes	109
4.3.5 Microbiología	111
4.4 CONCLUSIONES	114
4.5 BIBLIOGRAFÍA	115
 5. EVALUACIÓN DE LA TECNOLOGÍA SIAM PARA EL TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES DE LA INDUSTRIA LÁCTEA	
5.1 INTRODUCCIÓN	121
5.2 MATERIALES Y MÉTODOS	123
5.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	126
5.3.1 Resultados de la etapa metanogénica UASB	126
5.3.2 Eliminación de nutrientes y eficacia del postratamiento MBR	133
5.3.3 Comportamiento de la membrana de ultrafiltración del MBR y ensayos de ósmosis inversa	142
5.4 CONCLUSIONES	144

5.5 BIBLIOGRAFÍA.....	145
6. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE ELIMINACIÓN DE METANO DISUELTO, NITRÓGENO Y MICROCONTAMINANTES ORGÁNICOS EN CULTIVOS N-DAMO MEDIANTE BIORREACTORES DE MEMBRANAS	
6.1 INTRODUCCIÓN	153
6.2 MATERIALES Y MÉTODOS	156
6.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	159
6.3.1 Rendimiento del biorreactor de membrana R1	159
6.3.2 Composición de la comunidad microbiana en el biorreactor de membrana R1	162
6.3.3 El papel de bacterias n-damo en la eliminación de OMPs	166
6.3.4 Biorreactor de membrana R2.	168
6.3.5 Evolución de la diversidad microbiana en R2	177
6.4 CONCLUSIONES	179
6.5 BIBLIOGRAFÍA.....	180
CONCLUSIONES GENERALES.....	187

ABREVIACIONES

AGV	Ácidos grasos volátiles
AMO-D	Oxidación aerobia de metano acoplada a desnitrificación
AOB	Bacterias amonio oxidantes
BPA	Bisfenol A
CAPEX	Costes de inversión
CBZ	Carbamazepina
CID	Carbono inorgánico disuelto
CTD	Carbono total disuelto
DAF	Sistema de flotación por aire disuelto
DBO	Demanda biológica de oxígeno
DCF	Diclofenaco
DOC	Carbono orgánico disuelto
DQO	Demanda química de oxígeno
DZP	Diazepam
E1	Estrona
E2	Estradiol
EDAR	Estaciones depuradoras de aguas residuales
EDAR _i	Estación depuradora de aguas residuales industriales
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EE2	Etinil-estradiol
ERY	Eritromicina
FAS	Sulfato de amonio ferroso
FLX	Fluoxetina
GAC	Carbón activo granular
GC-MS	Cromatografía de gases - espectrometría de masas
GEI	Gases de efecto invernadero
HYME-D	Oxidación hipóxica de metano acoplada a desnitrificación
IBP	Ibuprofeno
IFAS	Sistema híbrido de lodos activos con película fija integrada
K _d	Coefficiente de sorción

kLa	Coefficiente volumétrico de transferencia de masa
LC-MS/MS	Cromatografía de líquidos - tandem espectrometría de masas
MBfR	Reactor de biopelícula de membrana
MBR	Biorreactor de membrana
MSGLR	Reactor air-lift con agitación magnética
MTD	Mejores técnicas disponibles
N-DAMO	Oxidación anaerobia de metano dependiente de nitrito/nitrato
NDIR	Analizador de infrarrojos no dispersivos
NOB	Bacterias nitrito oxidantes
NPX	Naproxeno
NT	Nitrógeno total
OD	Oxígeno disuelto
OI	Ósmosis inversa
OMP	Microcontaminantes orgánicos
OPEX	Costes de operación
ORP	Potencial de oxidación-reducción
ORR	Velocidad volumétrica de eliminación de materia orgánica
PAC	Carbón activo en polvo
PAO	Organismos acumuladores de fósforo
PBS	Disolución tampón de fosfato
PT	Fósforo total
PTM	Presión transmembrana
R	Relación de recirculación
RCTA	Reactor continuo de tanque agitado
ROX	Roxitromicina
SBR	Biorreactor discontinuo secuencial
SCADA	Sistema de registro de datos, control y supervisión
SIAL	Sistema integrado anaerobio metanogénico y lodos activos
SIAM	Sistema integrado anaerobio metanogénico y biorreactor de membranas
SMX	Sulfametoxazol
SRB	Bacterias sulfato reductoras
SSTLM	Sólidos en suspensión totales en el licor de mezcla
SSVLM	Sólidos en suspensión volátiles en el licor de mezcla
T	Temperatura
TCS	Triclosán

TMP	Trimetoprima
TOC	Carbono orgánico total
TRC	Tiempo de retención celular
TRH	Tiempo de retención hidráulico
UASB	Reactores de manto de lodo anaerobio de flujo ascendente
VCO	Velocidad de carga orgánica





RESUMEN

El objetivo principal de esta tesis es avanzar en los conocimientos de postratamientos para minimizar los impactos ambientales negativos de los efluentes de sistemas UASB para el tratamiento de aguas residuales de baja carga a temperatura ambiente, utilizando biorreactores de lodos activos híbridos, dotado tanto con membrana de filtración (proceso SIAM) o decantador secundario para la retención del lodo secundario (proceso SIAL). Entre esos impactos destacan la presencia de metano disuelto en el efluente y la baja capacidad de eliminación de nitrógeno, por limitaciones en la fuente de carbono. Para lograr este objetivo, se propone el empleo de metano disuelto como una fuente alternativa de dadores de electrones, para eliminar nitrógeno de las aguas residuales por medio de procesos biológicos.

Los tratamientos anaerobios mediante sistemas UASB se emplean con frecuencia en países con clima cálido y templado para el tratamiento de aguas residuales urbanas debido a su menor consumo de energía, recuperación de energía en forma de un biogás enriquecido en metano, y una menor producción de lodos en comparación con los tratamientos aerobios convencionales. Sin embargo, los efluentes obtenidos se caracterizan por una mala calidad atendiendo a parámetros de materia orgánica, nutrientes (nitrógeno y fósforo) y sólidos en suspensión. La presencia de nutrientes podría promover la eutrofización de las masas de agua receptoras del vertido. Además, se debe considerar que el metano es un Gas de Efecto Invernadero (GEI) con un potencial de calentamiento global 28 veces mayor al del CO₂, considerando un horizonte temporal de 100 años. Se debe considerar que hasta un 50% del metano generado, tras el tratamiento anaerobio metanógeno, permanece disuelto en el efluente pudiendo desorberse fácilmente a la atmósfera, incrementando con ello las emisiones de GEI de los sistemas de tratamiento de aguas residuales, con respecto al uso de tecnologías biológicas aerobias. Por tanto, estos sistemas necesitarán un postratamiento que sea capaz de minimizar el impacto negativo que llevan asociados los efluentes de sistemas UASB, eliminando nutrientes y metano disuelto.

En las últimas décadas se han evaluado postratamientos de sistemas UASB, principalmente biológicos aerobios o fisicoquímicos, observándose buenos resultados

de eliminación de materia orgánica y sólidos en suspensión. Sin embargo, no se alcanza la eliminación deseada de nutrientes. Los efluentes de sistemas anaerobios pueden presentar relaciones C/N bajas, como consecuencia de la eliminación por procesos anaerobios de materia orgánica para producir biogás, sin que se elimine nitrógeno en el proceso. Por tanto, es posible que la cantidad disponible de materia orgánica biodegradable en el efluente no sea suficiente para eliminar nitrógeno vía desnitrificación heterótrofa convencional y cumplir con los parámetros de vertido de nitrógeno. Una alternativa para el post-tratamiento de efluentes de sistemas UASB tratando aguas residuales de baja carga, urbanos o industriales, es el uso de procesos biológicos combinados de nitrificación parcial y desnitrificación, usando biomasa nitrificante y anammox en sistemas de un único o dos reactores, pero a pesar de los grandes avances y resultados prometedores, esta tecnología aún se halla en proceso de desarrollo. Sin embargo, existe otra alternativa de tratamiento biológico, que puede hacer frente tanto al inconveniente de la presencia de nitrógeno, como de metano disuelto basados en el uso de microorganismos oxidadores de metano. En los últimos años se ha señalado la posibilidad de emplear el metano disuelto como un dador de electrones para reducir especies oxidadas de nitrógeno, nitrito y nitrato, lo que podría mejorar la sostenibilidad de las plantas de tratamiento de aguas residuales. Las principales vías de oxidación de metano acopladas a desnitrificación son:

- a) Oxidación aerobia de metano acoplada a procesos de desnitrificación (AMO-D), donde los microorganismos metanótrofos aerobios oxidan metano a productos de oxidación intermedia, como metanol o acetato, que pueden ser empleados como fuente de carbono por microorganismos desnitrificantes heterótrofos convencionales para reducir nitrito o nitrato a nitrógeno gas.
- b) Oxidación anaerobia de metano acoplada a procesos de desnitrificación (n-damo). En este proceso están implicados dos grupos de microorganismos, n-damo arquea y n-damo bacteria. N-damo arquea oxida metano de forma anaerobia por el proceso de metanogénesis inversa mientras reduce nitrato a nitrito; n-damo bacteria realiza la oxidación de metano, pero reduce nitrito a nitrógeno gas, proceso en el que se elimina nitrógeno.
- c) Existen otras vías de oxidación de metano como la oxidación en condiciones hipóxicas (HYME-D), que no es objeto de esta tesis.

El contenido principal de cada capítulo se muestra a continuación.

CAPÍTULO 1. Introducción.

En este capítulo se presenta un análisis de los tratamientos anaerobios con sistemas UASB, sus ventajas asociadas a su bajo consumo de energía, producción de biogás que se puede valorizar energéticamente, menor producción de lodos o menores requerimientos de espacio, y sus desventajas, asociadas con la calidad del efluente obtenido, que se caracteriza por la presencia de concentraciones de materia orgánica y sólidos en suspensión relativamente elevadas, la pérdida de eficacia a temperaturas bajas, la baja eliminación de nutrientes o la presencia de metano disuelto o sulfuro de hidrógeno en el efluente, comparándolos con sistemas de tratamiento convencionales basados en lodos activos.

Se realiza un estudio de revisión de las tecnologías de postratamiento de efluentes de sistemas UASB, destacando su buen rendimiento en cuanto a eliminación de materia orgánica y sólidos en suspensión. Al ser un objetivo de esta tesis doctoral el fomentar la eliminación conjunta de nitrógeno y metano disuelto, se recopilan las alternativas posibles para la oxidación biológica de metano empleándolo como dador de electrones para el proceso de desnitrificación, en vez de añadir una fuente carbono externa. Se describieron las principales vías de eliminación conjunta de nitrógeno y metano, presentando un proceso desarrollado en nuestros laboratorios, proceso SIAM (Sistema Integrado Anaerobio metanogénico y biorreactor de Membranas) que consta de un primer reactor UASB y un Biorreactor de Membranas (MBR) con biopelículas y biomasa en suspensión, que se ha diseñado específicamente para eliminar nitrógeno y metano disuelto de efluentes de sistemas anaerobios, mostrando un resumen de los resultados logrados, previamente, por otros investigadores. Al final de este capítulo se presentan los objetivos principales y específicos de esta tesis doctoral.

CAPÍTULO 2. Materiales y métodos.

El capítulo 2 incluye los materiales y métodos generales empleados durante la experimentación para los cuatro capítulos experimentales de esta tesis (capítulos 3, 4, 5 y 6). Se detalla minuciosamente la metodología analítica utilizada en común en los cuatro capítulos experimentales. Este capítulo no es original, incluye metodología que no es propia. La inclusión de este capítulo en este documento se justifica con el propósito de facilitar información a otros investigadores, de los principales métodos analíticos usados en esta tesis.

CAPÍTULO 3. Eliminación de macro y microcontaminantes de aguas residuales, mediante el sistema integrado SIAL, formado por reactor UASB y postratamiento IFAS.

En este estudio se evaluó la capacidad de eliminación de contaminantes convencionales, metano disuelto y microcontaminantes orgánicos (OMPs) en un sistema combinado de UASB y lodos activos híbrido de biopelícula (IFAS) para el tratamiento de aguas residuales urbanas de baja carga denominado proceso SIAL (Sistema Integrado Anaerobio metanogénico y Lodos activos híbrido), y que es una modificación del proceso SIAM. La diferencia estriba en la sustitución de la etapa de filtración del MBR del proceso SIAM (estudiado en los capítulos 4 y 5) por un decantador secundario. El sistema cuenta con biopelículas tanto en el compartimento anóxico como en el aerobio, para incrementar las capacidades de eliminación de los contaminantes orgánicos y nitrógeno. El objetivo del proceso SIAL es lograr la eliminación del nitrógeno mediante el uso del metano disuelto como un dador de electrones, usando una tecnología de menor complejidad al usar decantador en vez de membranas de filtración, y estudiar de paso la eliminación biológica de microcontaminantes orgánicos (OMP) en un sistema en el que se cambia el potencial redox de forma drástica entre las diversas cámaras de las que consta, lo que podría fomentar la eliminación de OMPs.

En este capítulo se evaluó un prototipo SIAL a escala piloto, compuesto por una primera unidad anaerobia UASB, seguido de una etapa de afino mediante un sistema híbrido de lodos activos con biopelículas, IFAS. El sistema IFAS se compone de 2 compartimentos biológicos conectados en serie, anóxico, y aerobio, seguidos de un decantador secundario. Tanto en el compartimento anóxico como aerobio se emplearon soportes plásticos para fomentar el crecimiento de biopelículas.

Los resultados mostraron altas eliminaciones de DQO (93%); el metano disuelto presente en el efluente UASB (hasta un 85%) se eliminó, fundamentalmente, tanto en cámara anóxica como aerobia de la unidad de postratamiento por un consorcio de microorganismos, principalmente metanótrofos aeróbicos y desnitrificantes heterótrofos. Los metanótrofos presentes en la biomasa en suspensión y en biopelícula en los compartimentos anóxico y aerobio fueron los responsables de una eliminación que alcanzó el 85% de metano disuelto.

La eliminación de nitrógeno total varió a lo largo de la operación, distinguiéndose dos períodos 1 y 2. Se eliminó parcialmente en un 44% de nitrógeno durante el Período 1, donde estaban presentes tanto biomasa en suspensión como la biopelícula, mientras que esa eliminación bajó al 33% en el Período 2, donde la biomasa en suspensión se lavó y solo se mantuvo la biopelícula presente en los soportes plásticos, en este período 2 no se oxidó por completo el amonio. En la eliminación de nitrógeno estuvieron involucrados un consorcio de microorganismos desnitrificantes heterótrofos, oxidadores de metano, y microorganismos anammox.

La eliminación de OMPs se vio favorecida por la presencia de ambientes con diferentes potenciales de oxidación-reducción. La etapa anaerobia potenció la eliminación de trimetoprima (TMP), naproxeno (NPX), estradiol (E2) y sulfametoxazol (SMX). Se han encontrado pruebas de la biotransformación cometabólica de algunos de los OMP, como la influencia de la actividad de nitrificación en la eliminación de bisfenol A (BPA) y de la actividad de desnitrificación en la eliminación de etinil-estradiol (EE2). El crecimiento de bacterias anammox en la biopelícula tuvo un impacto positivo en la eliminación del antibiótico eritromicina (ERY). La eliminación de diclofenaco (DCF) mostró una correlación con la presencia de nitrito en el compartimento aerobio, mientras se observó que la eliminación de BPA dependió de la oxidación de nitrito.

CAPÍTULO 4. Impacto de los iones de azufre en la eficacia de eliminación de metano disuelto, nitrógeno total y microcontaminantes mediante la tecnología SIAM.

En este capítulo se propuso el sistema SIAM, una tecnología patentada por la Universidad de Santiago de Compostela (WO2014/118416 A1). En este proceso se usa un MBR híbrido preanóxico como postratamiento para efluentes de sistemas UASB que tratan aguas residuales de baja carga, fomentando el empleo de metano disuelto en el efluente anaerobio, como dador de electrones para el proceso de desnitrificación. Los tratamientos anaerobios no solo producen metano como fuente de electrones, si no también H_2S cuando tratan aguas residuales con presencia de ion sulfato. El H_2S se produce por la reducción de sulfato mediante bacterias sulfato reductoras, empleando materia orgánica como dadora de electrones. Posteriormente, dicho ion sulfuro puede ser empleado como dador de electrones en el proceso de desnitrificación. El prototipo SIAM operado presentó una modificación con respecto a estudios anteriores: se separó físicamente el compartimento aerobio de la etapa de

ultrafiltración, de modo que se facilitó el uso de biopelículas en la etapa aerobia con el fin de facilitar condiciones anóxicas/anaerobias y microaerobias.

El objetivo del presente estudio fue evaluar el rendimiento del novedoso proceso SIAM sobre las eficacias de eliminación de metano disuelto, nitrógeno total y microcontaminantes orgánicos, tanto en ausencia como en presencia de ion sulfato en la alimentación y ver su potencial efecto sobre las comunidades microbianas en la etapa de postratamiento MBR. Además, con objeto de mejorar los resultados previos y potenciar una mayor desnitrificación, se han realizado modificaciones en el diseño del sistema SIAM, dividiendo el volumen de la cámara de membranas, usada en tesis previas, en dos, una nueva cámara aerobia y una cámara de filtración de volumen más reducido.

Durante toda la operación del SIAM se observó una eliminación de DQO mayor al 98%, y de amonio mayor al 95%. En el compartimento anóxico se detectaron velocidades de eliminación de metano disuelto comprendidas entre 75 y 135 mg CH₄ L⁻¹ d⁻¹, con porcentajes de eliminación de 60-80%.

Gracias a la presencia de ambientes redox anaerobio, anóxico y aerobio, y a diferentes conformaciones de biomasa, en suspensión y biopelícula, el sistema obtuvo unas eficiencias de eliminación de OMPs elevadas (mayores al 70%) para muchos compuestos farmacéuticos, especialmente hormonas y antibióticos. En la etapa anaerobia del UASB se observó la eliminación de los compuestos fácilmente biotransformables bajo potenciales de oxidación-reducción anaerobios, como NPX, SMX, TMP y FLX. Los compuestos IBP, BPA y E1 se eliminaron casi por completo en el postratamiento, mientras otros compuestos, como ERY, ROX, E2, TCS, y parcialmente EE2, fueron eliminados conjuntamente en el UASB y MBR. Como era de esperar, no se observó degradación de DZP, DCF y CBZ, que muestran un comportamiento recalcitrante en sistemas biológicos.

El hecho de añadir un compartimento aerobio, separado de la etapa de filtración, permitió potenciar la eliminación de NT en el sistema SIAM, sin alterar el volumen utilizado del equipo. La eliminación de NT se incrementó gradualmente desde los 20 mg NT L⁻¹ obtenidos previamente en otros estudios, hasta aproximadamente 43 mg NT L⁻¹ sin la presencia de ion sulfuro como dador de electrones, poniendo de manifiesto la importancia de un compartimento aerobio con presencia de biopelícula. La adición de sulfuro como un dador extra de electrones no tuvo ningún impacto en

la eliminación de metano disuelto ni microcontaminantes, pero la eliminación de nitrógeno se incrementó hasta 63 mg NT L⁻¹. La modificación realizada en el diseño del MBR supuso una mejora del comportamiento del sistema. El uso de partículas de soporte en las cámaras aerobias y anóxica, potenció el crecimiento de bacterias metanótrofas aerobias, microorganismos anammox y nitrificantes en las biopelículas, con respecto a la biomasa en suspensión. Estas poblaciones tienen un efecto positivo tanto en la eliminación de nitrógeno como de metano disuelto.

CAPÍTULO 5. Evaluación de la tecnología SIAM para el tratamiento de aguas residuales de la industria láctea.

El objetivo de este capítulo se basa en demostrar la viabilidad de la utilización de un prototipo del proceso SIAM para el tratamiento “in situ” de aguas residuales generadas en una industria láctea de la comunidad gallega, mediante la combinación de un primer proceso biológico metanogénico UASB y un postratamiento mediante un biorreactor de membranas en el que se estimula el crecimiento de bacterias metanótrofas en la etapa MBR para la eliminación de metano disuelto presente en el efluente del UASB. Con ello se persigue reducir la emisión de GEI y la presencia de NT en el efluente.

El sistema SIAM de dos etapas UASB y MBR mostró ser robusto a pesar de la elevada variabilidad de concentración de contaminantes, temperatura y pH que se observó en el agua residual. El TRH aplicado al UASB fue de 11h mientras que en el postratamiento MBR fue de 15h. La alimentación al UASB contuvo un promedio de 1400 mg DQO L⁻¹, 66 mg NT L⁻¹ y 25 mg PT L⁻¹. Los resultados mostraron eliminaciones de DQO elevadas, un 68% en la etapa anaerobia y un 98% en el sistema global, con valores de DQO en el efluente final inferiores a 70 mg L⁻¹.

La conversión total de DQO a metano, considerando tanto el metano disuelto en el efluente como el metano presente en el biogás generado, fue del 40%. La eficacia del sistema UASB estuvo influenciada por la temperatura, el pH de entrada, así como por la concentración de DQO alimentada, generándose un biogás con un contenido del 60 al 80% de metano que se podría aprovechar para reducir el consumo de energía en la planta industrial.

El prototipo SIAM pudo eliminar, además, un 43% del fósforo alimentado, siendo la precipitación química con sales de Ca la vía más probable. El postratamiento

fue capaz de eliminar en torno al 25% del metano disuelto en el compartimento anóxico como resultado de la elevada presencia de materia orgánica procedente del UASB, que podría dificultar el crecimiento de microorganismos metanótrofos. El postratamiento MBR eliminó un 70-85% del NT presentes en el efluente del UASB, usando para ello la DQO remanente presente en el efluente de la etapa anaerobia. La concentración de NT presente en el permeado fue menor a 13 mg L^{-1} durante un largo período experimental. La producción aparente de biomasa en el SIAM fue de $0,11 \text{ g SST g}^{-1} \text{ DQO}$ tratada, muy inferior a la que se genera mediante tratamiento biológico aerobio. La tecnología SIAM generó un efluente de alta calidad, libre de sólidos en suspensión, bajo contenido en DQO que podría facilitar una potencial reutilización del agua depurada en la factoría.

CAPÍTULO 6. Evaluación de la capacidad de eliminación de metano disuelto, nitrógeno y microcontaminantes orgánicos en cultivos n-damo mediante biorreactores de membranas.

Los sistemas n-damo bacteria son una alternativa prometedora para minimizar el impacto ambiental de efluentes de sistemas UASB en el tratamiento de aguas residuales a temperatura ambiente, dado que eliminan metano y nitrógeno de forma simultánea y, además, no generan N_2O como producto intermedio. Además, los microorganismos n-damo presentan una menor producción de lodo en comparación con los microorganismos heterótrofos convencionales y el proceso n-damo bacteria es estequiométricamente más favorable que la oxidación aerobia de metano AMO-D eliminando el doble del nitrógeno que la ruta aerobia, usando la misma cantidad de metano.

Sin embargo, son escasos los casos de éxito de estos sistemas tratando aguas reales, y los estudios realizados en laboratorios indican que estos microorganismos presentan tiempos de duplicación elevados y actividades bajas o moderadas, con pérdidas parciales, sin causa aparente, de la actividad tras largos períodos de operación.

El objetivo de este estudio es proporcionar información relevante para el desarrollo de procesos biológicos basados en n-damo bacteria para la eliminación simultánea de metano y nitrito. Se evaluó específicamente el crecimiento de bacterias n-damo en dos biorreactores de membrana, en el que se están desarrollando estos nuevos microorganismos, tratando un afluente sintético que estimule su crecimiento

y ver potenciales factores que afectan positiva o negativamente al mismo. La eliminación de iones de nitrógeno y metano disueltos será objeto de seguimiento junto con las capacidades de este proceso para eliminar microcontaminantes orgánicos.

En un primer biorreactor de membrana, denominado R1, se logró obtener un cultivo enriquecido en n-damo en poco tiempo, obteniendo velocidades de eliminación de nitrito de $24 \text{ mg NO}_2^- \cdot \text{N L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ en tan solo 30 días. Una vez obtenida una actividad apreciable en este sistema se estudió la eficacia de eliminación de microcontaminantes orgánicos, ya que no había reseñas bibliográficas previas, observando eliminaciones elevadas para E1 y E2, mientras se eliminaron parcialmente FLX, ERY, ROX y SMX.

En el segundo biorreactor de membrana R2 se siguieron diferentes estrategias de cara a potenciar la estabilidad y capacidad desnitrificante de los cultivos n-damo. La entrada de pequeñas cantidades de oxígeno con el medio de alimentación pareció fomentar ligeramente la actividad desnitrificante a corto plazo, observando puntas de actividad de $88 \text{ mg N L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, pero no resuelve los problemas de estabilidad observados, por lo que se procedió a desoxigenar las bolsas de alimentación. El aumento ligero en la salinidad del alimento utilizado, usando hasta un 5% de agua de mar, no causó tampoco ningún efecto positivo o negativo aparente en la actividad de los microorganismos n-damo. En este estudio se observó que el medio empleado favoreció la formación de precipitados de fosfatos inorgánicos sobre el lodo, disminuyendo la proporción de SSV en el lodo al 80%. A partir del día de operación 717 se modificó la concentración de los macronutrientes fósforo y calcio en el medio de alimentación, reduciendo la concentración de CaCl_2 y KH_2PO_4 respectivamente a 20 y 5 mg L^{-1} , logrando con esa acción reducir la aparición de precipitados de fosfato de calcio, que se observaban en el cultivo microbiano. Esta acción causó una mejora tanto en la estabilidad del sistema, no observando caídas de capacidad sin causa aparente ni generación de trazas de N_2O del sistema, y alcanzando una capacidad desnitrificante de $118 \text{ mg NO}_2^- \cdot \text{N L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ pero que no se incrementaba por encima de dicho valor. A pesar de estar presentes en el medio alimentado, se detectó una baja biodisponibilidad de metales traza como hierro y cobre en el permeado de R2 por lo que en el día de operación 787 se añadió un agente quelante de metales, Na_2EDTA , al medio de alimentación que evitase su precipitación en el sistema. El resultado ha sido una subida inmediata en la actividad del reactor hasta alcanzar la velocidad máxima de eliminación de nitrito de $282,7 \text{ mg NO}_2^- \cdot \text{N L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, manteniendo durante los últimos 35 días de operación una capacidad desnitrificante de $262,2 \pm 9,2 \text{ mg NO}_2^- \cdot \text{N L}^{-1} \text{ d}^{-1}$.



RESUMO

O obxectivo principal de esta tese é avanzar nos coñecementos de postratamentos para minimizar os impactos ambientais negativos dos efluentes de sistemas UASB para o tratamento de augas residuais de baixa carga a temperatura ambiente, empregando biorreactores de lodos activos híbridos, dotado tanto con membrana de filtración (proceso SIAM) como con decantador secundario para a retención do lodo secundario (proceso SIAL). Entre eses impactos destacan a presenza de metano disolto no efluente e a baixa capacidade de eliminación de nitróxeno. Para lograr este obxectivo, propónse o emprego de metano disolto como unha fonte alternativa de dadores de electróns, para eliminar nitróxeno das augas residuais por medio de procesos biolóxicos.

Os tratamentos anaerobios mediante sistemas UASB empréganse con frecuencia en países con clima cálido ou temperado para o tratamento de augas residuais urbanas debido ao seu menor consumo de enerxía, recuperación de enerxía en forma de biogás enriquecido en metano, e unha menor produción de lodo en comparación cos tratamentos aerobios convencionais. Sen embargo, os efluentes obtidos caracterízanse por unha mala calidade atendendo a parámetros de materia orgánica, nutrientes (nitróxeno e fósforo) e materia en suspensión. A presenza de nutrientes podería promover a eutrofización das masas de auga receptoras do vertido. Ademais, débese considerar que o metano é un Gas de Efecto Invernadoiro (GEI) cun potencial de quentamento global 28 veces superior ao do CO₂, considerando un horizonte temporal de 100 anos. Débese considerar que ata un 50% do metano xerado, tras o tratamento anaerobio metanoxénico, permanece disolto no efluente, podendo desorberse facilmente á atmosfera, incrementando as emisións de GEI dos sistemas de tratamento de augas residuais, respecto ao emprego de tecnoloxías biolóxicas aerobias. Polo tanto, estes sistemas necesitarán un postratamento que sexa capaz de minimizar o impacto negativo que levan asociado os efluentes de sistemas UASB, eliminando nutrientes e metano disolto.

Nas últimas décadas avaliáronse postratamentos de sistemas UASB, principalmente biolóxicos aerobios ou fisicoquímicos, observándose bos resultados en termos de eliminación de materia orgánica e materia en suspensión. Sen embargo, non se alcanza a eliminación desexada de nutrientes. Os efluentes de sistemas

anaerobios poden presentar relacións C/N baixas, como consecuencia da eliminación por procesos anaerobios de materia orgánica para producir biogás, sen que se elimine nitróxeno no proceso. Por tanto, é posible que a cantidade dispoñible de materia orgánica biodegradable no efluente non sexa suficiente para eliminar nitróxeno vía desnitrificación heterótrofa convencional e cumprir cos parámetros de vertido de nitróxeno. Unha alternativa para o postratamento de efluentes de sistemas UASB tratando augas residuais de baixa carga, urbanas ou industriais, é o emprego de procesos biolóxicos combinados de nitrificación parcial e desnitrificación, empregando biomasa nitrificante e anammox en sistemas de un único ou dous reactores. Pero a pesar dos grandes avances e resultados prometedores, esta tecnoloxía inda se atopa en proceso de desenvolvemento. Sen embargo, existe outra alternativa de tratamento biolóxico, que pode facer fronte tanto á desvantaxe da presenza de nitróxeno, como de metano disolto, baseada no uso de microorganismos oxidadores de metano. Nos últimos anos sinalouse a posibilidade de empregar o metano disolto como un dador de electróns para reducir especies oxidadas de nitróxeno, nitrito ou nitrato, o que podería mellorar a sostibilidade das estacións de tratamento de augas residuais. As principais vías de oxidación de metano apareladas a desnitrificación son:

- a) Oxidación aerobia de metano aparelada a procesos de desnitrificación (AMO-D), onde os microorganismos metanótrofos aerobios oxidan metano a produtos de oxidación intermedia, como metanol ou acetato, que poden ser empregados como fonte de carbono por microorganismos desnitrificantes heterótrofos convencionais para reducir nitrito ou nitrato a nitróxeno gas.
- b) Oxidación anaerobia de metano aparelada a procesos de desnitrificación (n-damo). Neste proceso están implicados dous grupos de microorganismos, n-damo arquea e n-damo bacteria. N-damo arquea oxida metano de forma anaerobia polo proceso de metanoxénese inversa mentres reduce nitrato a nitrito; n-damo bacteria realiza a oxidación de metano, pero reduce nitrito a nitróxeno gas, proceso no que se elimina nitróxeno.
- c) Existen outras vías de oxidación de metano como a oxidación en condicións hipóxicas (HYME-D), que non é obxecto de esta tese.

O contido principal de cada capítulo móstrase a continuación.

CAPÍTULO 1. Introducción.

Neste capítulo presentase unha análise dos tratamentos anaerobios con sistemas UASB, as súas vantaxes asociadas ao seu baixo consumo de enerxía, produción de biogás que se pode valorizar enerxéticamente, menor produción de lodo ou menores requirimentos de espazo, e as súas desvantaxes, asociadas á calidade do efluente obtido, que se caracteriza pola presenza de concentracións de materia orgánica e materia en suspensión relativamente elevadas, a perda de eficacia a temperaturas baixas, a baixa eliminación de nutrientes ou a presenza de metano disolto ou sulfuro de hidróxeno no efluente, comparándoos con sistemas de tratamento convencionais baseados en lodos activos.

Realízase un estudo de revisión das tecnoloxías de postratamento de efluentes de sistemas UASB, destacando o seu bo rendemento en canto a eliminación de materia orgánica e materia en suspensión. Ao ser un obxectivo desta tese de doutoramento fomentar a eliminación conxunta de metano disolto e nitróxeno, recompílanse as alternativas posibles para a oxidación biolóxica de metano empregándoo como dador de electróns para o proceso de desnitrificación, en vez de engadir unha fonte de carbono externa. Descríbense as principais vías de eliminación conxunta de metano e nitróxeno, presentando un proceso desenvolto nos nosos laboratorios, proceso SIAM (Sistema Integrado Anaerobio metanoxénico e biorreactor de Membranas) que consta dun primeiro reactor UASB e un Biorreactor de Membranas (MBR) con biopelículas e biomasa en suspensión, que se deseñou especificamente para eliminar nitróxeno e metano disolto de efluentes de sistemas anaerobios, mostrando un resumo dos resultados alcanzados previamente por outros investigadores. Ao final deste capítulo preséntanse os obxectivos principais e específicos desta tese de doutoramento.

CAPÍTULO 2. Materiais y métodos.

O capítulo 2 inclúe os materiais e métodos xerais empregados durante a experimentación para os catro capítulos experimentais desta tese (capítulos 3, 4, 5 e 6). Detállase minuciosamente a metodoloxía analítica empregada en común nestes catro capítulos. A inclusión deste capítulo neste documento xustifícase co propósito de facilitar información a outros investigadores, dos principais métodos analíticos empregados nesta tese.

CAPÍTULO 3. Eliminación de macro e microcontaminantes de augas residuais, mediante o sistema integrado SIAL, formado por reactor UASB e postratamento IFAS.

Neste estudo avaliou-se a capacidade de eliminación de contaminantes convencionais, metano disolto e microcontaminantes orgánicos (OMPs) nun sistema combinado de UASB e lodos activos híbrido de biopelícula (IFAS) para o tratamento de augas residuais urbanas de baixa carga denominado proceso SIAL (Sistema Integrado Anaerobio metanoxénico e Lodos activos híbrido), que é unha modificación do proceso SIAM. A diferenza estriba na substitución da etapa de filtración do MBR do proceso SIAM (estudado en capítulos 4 e 5) por un decantador secundario. O sistema conta con biopelículas tanto no compartimento anóxico como no aerobio, para incrementar as capacidades de eliminación dos contaminantes orgánicos e nitróxeno. O obxectivo do proceso SIAL é lograr a eliminación do nitróxeno mediante o emprego do metano disolto como un dador de electróns, usando unha tecnoloxía de menor complexidade ao empregar decantador en vez de membranas de filtración, e estudar de paso a eliminación biolóxica de microcontaminantes orgánicos nun sistema no que se cambia o potencial redox de forma drástica entre os diversos compartimentos dos que consta, o que podería fomentar a eliminación de OMPs.

Neste capítulo avaliou-se un prototipo SIAL a escala piloto, composto por unha primeira unidade anaerobia UASB, seguida dunha etapa de afino mediante un sistema híbrido de lodos activos con biopelículas, IFAS. O sistema IFAS componse de 2 compartimentos biolóxicos conectados en serie, anóxico e aerobio, seguidos dun decantador secundario. Tanto no compartimento anóxico como no aerobio empregáronse soportes plásticos para fomentar o crecemento de biopelículas.

Os resultados mostraron eliminacións elevadas de DQO (93%); o metano disolto presente no efluente do UASB eliminouse, fundamentalmente, tanto en cámara anóxica como aerobia da unidade de postratamento, por un consorcio de microorganismos principalmente metanótrofos aerobios e desnitrificantes heterótrofos. Os metanótrofos presentes na biomasa en suspensión e na biopelícula nos compartimentos anóxico e aerobio foron os responsables dunha eliminación que alcanzou o 85% de metano disolto.

A eliminación de nitróxeno total variou ao longo da operación, diferenciándose dous períodos 1 e 2. Eliminouse parcialmente un 44% de nitróxeno durante o Período 1, onde estaban presentes tanto biomasa en suspensión como a biopelícula, mentres que esa eliminación descendeu ata o 33% no Período 2, onde se lavou a biomasa en suspensión e soamente estaba presente a biopelícula adherida aos soportes plásticos. No Período 2 non se oxidou por completo o amonio. Na eliminación de nitróxeno estiveron involucrados un consorcio de microorganismos desnitrificantes heterótrofos, oxidadores de metano, e microorganismos anammox.

A eliminación de OMPs viuse favorecida pola presenza de ambientes con diferentes potenciais de oxidación-redución. A etapa anaerobia potenciou a eliminación de trimetoprima (TMP), naproxeno (NPX), estradiol (E2) e sulfametoxazol (SMX). Atopáronse probas da biotransformación cometabólica dalgúns dos OMPs, como a influencia da actividade de nitrificación na eliminación de bisfeno A (BPA) e da actividade de desnitrificación na eliminación de etinil-estradiol (EE2). O crecemento de bacterias anammox na biopelícula tivo un impacto positivo na eliminación do antibiótico eritromicina (ERY). A eliminación de diclofenaco (DCF) amosou unha correlación coa presenza de nitrito no compartimento aerobio, mentres se observou que a eliminación de BPA dependeu da oxidación de nitrito.

CAPÍTULO 4. Impacto dos ións de xofre na eficacia de eliminación de metano disolto, nitróxeno total e microcontaminantes mediante a tecnoloxía SIAM.

Neste capítulo propúxose o sistema SIAM, unha tecnoloxía patentada pola Universidade de Santiago de Compostela (WO2014/118416 A1). Neste proceso emprégase un MBR híbrido preanóxico como postratamento para efluentes de sistemas UASB que tratan augas residuais de baixa carga, fomentando o uso de metano disolto presente no efluente anaerobio, como dador de electróns para o proceso de desnitrificación. Os tratamentos anaerobios non só producen metano como fonte de electróns, senón que tamén producen H_2S cando tratan augas residuais con presenza de ión sulfato. O H_2S prodúcese pola redución de sulfato mediante bacterias sulfato reductoras, empregando materia orgánica como dadora de electróns. Posteriormente, o ión sulfuro pode ser empregado como dador de electróns no proceso de desnitrificación. O prototipo SIAM operado presentou unha modificación respecto a estudos anteriores: separouse físicamente o compartimento aerobio da etapa de

RESUMO

ultrafiltración, de modo que se facilitou o uso de biopelículas na etapa aerobia co fin de facilitar condicións anóxicas/anaerobias e microaerobias.

O obxectivo do presente estudo foi avaliar o rendemento do proceso novidoso SIAM sobre as eficacias de eliminación de metano disolto, nitróxeno total e microcontaminantes orgánicos, tanto en ausencia como en presenza do ión sulfato na alimentación e ver o seu potencial efecto sobre as comunidades microbianas na etapa de postratamento MBR. Ademais, co obxecto de mellorar os resultados previos e potenciar unha desnitrificación maior, realizáronse modificacións no deseño do sistema SIAM, dividindo o volume da cámara de membranas, empregada en teses previas, en dúas, unha nova cámara aerobia e unha cámara de filtración de volume mais reducido.

Durante toda a operación do SIAM observouse unha eliminación de DQO maior ao 98% e de amonio maior ao 95%. No compartimento anóxico detectáronse velocidades de eliminación de metano disolto comprendidas entre 75 e 135 mg CH₄ L⁻¹ d⁻¹, con porcentaxes de eliminación do 60-80%.

Grazas á presenza de ambientes redox anaerobio, anóxico e aerobio, e a diferentes conformacións da biomasa, en suspensión e biopelícula, o sistema obtivo unhas eficiencias de eliminación de OMPs elevadas (maiores ao 70%) para moitos compostos farmacéuticos, especialmente hormonas e antibióticos. Na etapa anaerobia do UASB observouse a eliminación dos compostos facilmente biotransformables baixo potenciais de oxidación-redución anaerobios, como NPX, SMX, TMP e FLX. Os compostos IBP, BPA e E1 elimináronse case por completo no postratamento, mentres outros compostos, como ERY, ROX, E2, TCS e parcialmente EE2, foron eliminados conxuntamente no UASB e MBR. Como cabía esperar, non se observou degradación de DZP, DCF e CBZ, que mostrar un comportamento recalcitrante en sistemas biolóxicos.

O feito de engadir un compartimento aerobio, separado da etapa de filtración, permitiu potenciar a eliminación de NT no sistema SIAM, sen alterar o volume empregado no equipo. A eliminación de NT incrementouse gradualmente dende os 20 mg NT L⁻¹ obtidos previamente noutros estudos, ata aproximadamente 43 mg NT L⁻¹ sen a presenza de ión sulfuro como dador de electróns, mostrando a relevancia do compartimento aerobio con presenza de biopelícula. A adición de sulfuro como un

dador extra de electróns non tivo ningún impacto na eliminación de metano disolto nin microcontaminantes, pero a eliminación de nitróxeno incrementouse ata hasta 63 mg NT L⁻¹. A modificación realizada no deseño do MBR supuxo unha mellora do comportamento do sistema. O uso de partículas de soporte nos compartimentos aerobio e anóxico fomentou o crecemento de bacterias metanótrofas aerobias, microorganismos anammox e nitrificantes nas biopelículas, con respecto a biomasa en suspensión. Estas poboacións teñen un efecto positivo tanto na eliminación de nitróxeno como de metano disolto.

CAPÍTULO 5. Avaliación da tecnoloxía SIAM para o tratamento de augas residuais de la industria láctea.

O obxectivo deste capítulo basease en demostrar a viabilidade do emprego dun prototipo do proceso SIAM para o tratamento “in situ” de augas residuais xeradas nunha industria láctea da comunidade galega, mediante a combinación dun primeiro proceso biolóxico metanoxénico UASB e un postratamento mediante un biorreactor de membranas no que se estimula o crecemento de bacterias metanótrofas na etapa MBR para a eliminación de metano disolto presente no efluente do UASB. Con elo perséguese reducir a emisión de GEI e a presenza de NT no efluente.

O sistema SIAM de dúas etapas UASB e MBR mostrou un comportamento robusto a pesar da elevada variabilidade de concentración de contaminantes, temperatura e pH que se observou na auga residual. O TRH aplicado ao UASB foi de 11h mentres que no postratamento MBR foi de 15h. A alimentación ao UASB contivo unha media de 1400 mg DQO L⁻¹, 66 mg NT L⁻¹ y 25 mg PT L⁻¹. Os resultados mostraron eliminacións de DQO elevadas, un 68% na etapa anaerobia e un 98% no sistema global, con valores de DQO no efluente final inferiores a 70 mg L⁻¹.

A conversión total de DQO a metano, considerando tanto o metano disolto no efluente como o metano presente no biogás xerado, foi do 40%. A eficacia do sistema UASB estivo influenciada pola temperatura, o pH de entrada, así como pola concentración de DQO alimentada, xerándose un biogás cun contido do 60-80% de metano que se podería aproveitar para reducir o consumo de enerxía na planta industrial.

O prototipo SIAM puido eliminar, ademais, un 43% do fósforo alimentado, sendo a precipitación química con sales de Ca a vía mais probable. O postratamento

foi capaz de eliminar en torno ao 25% de metano disolto no compartimento anóxico como resultado da elevada presenza de materia orgánica procedente do UASB, que podería dificultar o crecemento de microorganismos metanótrofos. O postratamento MBR eliminou un 70-85% do NT presente no efluente do UASB, empregando a DQO remanente presente no efluente anaerobio. A concentración de NT presente no permeado foi menor a 13 mg L^{-1} durante un longo período experimental. A produción aparente de biomasa no SIAM foi de $0,11 \text{ g SST g}^{-1} \text{ DQO}$ tratada, moi inferior á que se xera en tratamentos biolóxicos aerobios. A tecnoloxía SIAM xerou un efluente de alta calidade, libre de materia en suspensión e baixo contido en DQO, que podería facilitar unha potencial reutilización da auga depurada na factoría.

CAPÍTULO 6. Avaliación da capacidade de eliminación de metano disolto, nitróxeno e microcontaminantes orgánicos en cultivos n-damo mediante biorreactores de membranas.

Os sistemas n-damo bacteria son unha alternativa prometedora para minimizar o impacto ambiental de efluentes de sistemas UASB no tratamento de augas residuais a temperatura ambiente, dado que eliminan conxuntamente metano e nitróxeno e, ademais, non xeran N_2O como produto intermedio. Os microorganismos n-damo presentan unha menor produción de lodo comparados con microorganismos heterótrofos convencionais e o proceso n-damo bacteria é, atendendo á estequiometría, mais favorable que a oxidación aerobia de metano AMO-D, eliminando o dobre de nitróxeno que a ruta aerobia para a mesma cantidade de metano.

Sen embargo, son escasos os casos de éxito destes sistemas tratando augas reais, e os estudos realizados en laboratorios indican que estes microorganismos presentan tempos de duplicación elevados e actividades baixas ou moderadas, con perdas parciais, sen causa aparente, da actividade despois de períodos de operación longos.

O obxectivo deste estudo é proporcionar información relevante para o desenvolvemento de procesos biolóxicos baseados en n-damo bacteria para a eliminación de metano e nitrito. Avaliouse especificamente o crecemento de bacterias n-damo en dous biorreactores de membranas, onde se están desenvolvendo estes novos microorganismos, tratando un afluente sintético que estimule o seu crecemento e ver factores potenciais que afecten positiva ou negativamente ao proceso. A

eliminación de ións de nitróxeno e metano disolto será obxecto de seguimento xunto coas capacidades deste proceso para eliminar microcontaminantes orgánicos.

Nun primeiro biorreactor de membrana, denominado R1, conseguiuase obter un cultivo enriquecido en n-damo bacteria en pouco tempo, obtendo velocidades de eliminación de nitrito de $24 \text{ mg NO}_2^- \text{-N L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ en tan só 30 días. Unha vez obtida unha actividade apreciable neste sistema, estudouse a eficacia de eliminación de microcontaminantes orgánicos, xa que non había datos bibliográficos previos, observando eliminacións elevadas para E1 e E2, mentres que se eliminaron parcialmente FLX, ERY, ROX e SMX.

No segundo biorreactor de membrana R2 seguíronse diferentes estratexias de cara a potenciar a estabilidade e capacidade desnitrificante dos cultivos n-damo. A entrada de pequenas cantidades de osíxeno co medio de alimentación pareceu fomentar lixeiramente a actividade desnitrificante a curto prazo, observando puntas de actividade de $88 \text{ mg N L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, pero non resolve os problemas de estabilidade observados, polo que se procedeu a desosixenar as bolsas de alimentación. O lixeiro aumento de salinidade empregado no alimento, usando ata un 5% de auga de mar, tampouco causou efecto algún positivo ou negativo aparente na actividade do sistema. Neste estudo observouse que o medio empregado favoreceu a formación de precipitados de fosfatos inorgánicos sobre o lodo, diminuindo a proporción de SSV no lodo ao 80%. A partir do día de operación 717 modificouse a concentración dos macronutrientes fósforo e calcio no medio de alimentación, reducindo a concentración de CaCl_2 y KH_2PO_4 respectivamente a 20 y 5 mg L^{-1} , logrando desa maneira reducir a aparición de precipitados de fosfato de calcio, que se observaran no cultivo microbiano. Esta acción causou unha mellora tanto na estabilidade do sistema, non observando perdas da capacidade sen causa aparente nin xeración de trazas de N_2O no sistema, e alcanzando unha actividade desnitrificante de $118 \text{ mg NO}_2^- \text{-N L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ pero sen incrementarse por riba dese valor. A pesar de estar presentes no medio alimentado, detectouse unha baixa biodisponibilidade de metais traza como ferro e cobre no permeado de R2, polo que no día de operación 787 engadiuse un axente quelante de metais, Na_2EDTA , ao medio de alimentación, que evitase a súa precipitación no sistema. O resultado foi un incremento inmediato da actividade do reactor ata alcanzar unha velocidade máxima de eliminación de nitrito de $282,7 \text{ mg NO}_2^- \text{-N L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, mantendo durante os últimos 35 días de operación unha capacidade desnitrificante de $262,2 \pm 9,2 \text{ mg NO}_2^- \text{-N L}^{-1} \text{ d}^{-1}$.



OBJETIVOS

El objetivo principal de esta tesis es mejorar tecnologías y procesos biológicos que contribuyan a disminuir la huella ambiental que presentan los efluentes de sistemas UASB tratando aguas residuales de baja carga a temperatura ambiente. Entre los inconvenientes figuran la presencia de metano disuelto, un fuerte GEI que contribuye a aumentar el impacto ambiental de calentamiento global, y el bajo o nulo potencial de eliminación de nitrógeno que afectaría negativamente al potencial de eutrofización de estos sistemas. Para hacer frente a estos dos inconvenientes, se plantea el uso del metano presente en el efluente de sistemas UASB como un dador de electrones para llevar a cabo el proceso de desnitrificación en un postratamiento. Para la consecución de este objetivo principal se han establecido unos objetivos concretos:

- Investigar la eliminación de microcontaminantes orgánicos, metano disuelto, materia orgánica y nitrógeno en un sistema SIAL que consta de un reactor UASB y un postratamiento un reactor anaerobio de manto de lodo de flujo ascendente (UASB) con un sistema híbrido de lodos activos con película fija integrada (IFAS). El sistema combina condiciones redox anaerobias, anóxicas y aerobias en diferentes etapas, donde la biomasa se desarrolla en diferentes configuraciones: granular, floculenta y biopelícula (Capítulo 3).
- Mejorar tecnológicamente el proceso SIAM, compuesto por una unidad UASB y un postratamiento de biorreactor de membrana (MBR), y evaluar su rendimiento de eliminación de metano disuelto, nitrógeno total y microcontaminantes orgánicos tanto en ausencia como presencia de ion sulfato en la alimentación. Para ello, se realizaron modificaciones en el diseño del prototipo MBR, repartiendo el volumen de la cámara de filtración en dos, con un nuevo compartimento aerobio con biopelículas, con el fin de promover la existencia de ambientes anóxico/anaerobios que pudiesen incentivar los procesos de nitrificación-desnitrificación en dicha cámara, así como una cámara de filtración de menor volumen (Capítulo 4).

OBJETIVOS

- Demostrar la tecnología SIAM, patente UE EP2952483A1 de la Universidade de Santiago de Compostela, con agua residual real de baja carga en una industria láctea de cara a implantar esta tecnología en el mercado. La presencia de la membrana permitiría el obtener un efluente de alta calidad que podría favorecer los tratamientos posteriores de recuperación del agua tratada para ser reutilizada (Capítulo 5).

Evaluar específicamente el crecimiento de bacterias n-damo en un biorreactor de membrana, en el que se están desarrollando estos microorganismos. En un primer reactor, se estudiará la eliminación de iones de nitrógeno y metano disuelto, así como las capacidades de este proceso para eliminar microcontaminantes orgánicos; en un segundo reactor se estudiarán las causas que provocan la inestabilidad del sistema a largo plazo, estudiando el impacto de diversos parámetros, oxígeno, salinidad, presencia de iones y concentración de metales traza en la capacidad de dicho biorreactor (Capítulo 6).

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

Resumen

Los sistemas UASB se emplean con frecuencia en regiones con clima cálido y templado para tratar aguas residuales urbanas y de forma generalizada en todo el mundo para tratar aguas residuales industriales, incluyendo las de baja carga, debido al menor consumo de energía que presentan con la generación de un biogás enriquecido en metano, y la reducción de la producción de lodo, con respecto a un sistema aerobio convencional basado en lodos activos. Sin embargo, a bajas temperaturas una fracción del metano generado permanece disuelto en el efluente de los sistemas UASB, pudiendo ser desorbido fácilmente a la atmósfera. El metano es un GEI con un potencial de calentamiento global 28 veces superior al del CO₂, por lo que se incrementarían notablemente las emisiones de GEI.

Los efluentes de sistemas UASB se caracterizan por tener una mala calidad debido a la presencia de materia orgánica, nutrientes y sólidos en suspensión que exceden habitualmente, los valores señalados en los límites de vertido. Por ello, las aguas depuradas en estos sistemas requieren de una etapa de postratamiento para adecuar las características del agua tratada a los requerimientos de vertido. Aunque a día de hoy no existan requisitos legales sobre emisiones de GEI de plantas de tratamiento biológico, resulta importante el desarrollar postratamientos que logren la eliminación biológica del metano disuelto, e incluso en los que este compuesto pueda servir de fuente de carbono que contribuya a eliminar nitrógeno presente en los efluentes de los sistemas anaerobios.

En este capítulo se hace una revisión del estado del arte de los sistemas de postratamiento de efluentes de reactores UASB, señalando además los objetivos y el alcance de esta tesis doctoral, centrándose concretamente en la investigación, diversificación y potencial optimización de las tecnologías SIAM y SIAL, desarrolladas por la USC, en las que se potencia la eliminación de metano disuelto y nitrógeno total, de efluentes de sistemas UASB, utilizando biorreactores híbridos de

membranas (SIAM) o alternativamente sistemas híbridos de lodos activos (SIAL). Además, como objetivo particular de esta tesis se profundizará en los factores que potencian el crecimiento de bacterias n-damo, de desnitrificación por oxidación anaerobia de metano, en biorreactores de membrana, con el fin de adquirir conocimiento que permita una posible potenciación de este proceso en la tecnología SIAM desarrollada.



ÍNDICE DE CONTENIDOS - CAPÍTULO 1

1.1 TRATAMIENTO ANAEROBIO DE AGUAS RESIDUALES	1
1.1.1 Tratamientos anaerobios para aguas residuales de baja carga	1
1.1.2 Sistemas de manto de lodo anaerobio de flujo ascendente (UASB) para el tratamiento de aguas residuales domésticas.....	2
1.1.3 Ventajas de los sistemas UASB frente a procesos aerobios.....	3
1.1.4 Desventajas de los sistemas UASB frente a procesos aerobios	6
1.2 ALTERNATIVAS PARA EL POSTRATAMIENTO DE EFLUENTES DE SISTEMAS UASB.....	8
1.3 ELIMINACIÓN DE NITRÓGENO	13
1.4 ELIMINACIÓN DE FÓSFORO	16
1.5 ELIMINACIÓN CONJUNTA DE METANO Y NITRÓGENO	16
1.6 BIBLIOGRAFÍA	20



1.1 TRATAMIENTO ANAEROBIO DE AGUAS RESIDUALES

La digestión anaerobia es un proceso de fermentación mediante el cual una mezcla simbiótica de microorganismos, en condiciones de ausencia de oxígeno, transforman la materia orgánica biodegradable en un biogás compuesto principalmente por metano (50-80%) y dióxido de carbono (20-50%), pequeñas cantidades de amoníaco, sulfuro de hidrógeno, hidrógeno, nutrientes y materia celular adicional (Merlin Christy et al., 2014). En este proceso de oxidación-reducción anaerobia de materia orgánica, se produce una reacción de dismutación en la que parte del carbono presente es oxidado a dióxido de carbono y otra parte reducida a metano. La formación de metano se favorece en medios donde el oxígeno, el nitrato o el sulfato no están presentes, ya que estos promoverían la oxidación aerobia o anóxica de materia orgánica (Von Sperling and De lemos Chernicharo, 2005). Entre los sistemas anaerobios de tratamiento de aguas residuales los reactores de manto de lodo anaerobio de flujo ascendente (UASB) se han ganado un espacio destacado en el tratamiento de aguas residuales, ofreciendo resultados exitosos en regiones con clima cálido o templado. Estos escenarios permitieron un cambio de perspectiva, pasando del rechazo a la aceptación actual generalizada del uso de estos sistemas para el tratamiento de aguas residuales urbanas en zonas tropicales del planeta (Von Sperling and De lemos Chernicharo, 2005). La tecnología anaerobia de tratamiento de aguas residuales industriales suele usarse desde hace décadas para el tratamiento de aguas, especialmente cuando estas presentan concentraciones superiores de $1\text{-}2\text{ g L}^{-1}$ de DQO.

Por tanto, la digestión anaerobia se ha posicionado como una tecnología adecuada para el tratamiento aguas residuales urbanas e industriales, con un potencial atractivo debido a la generación de energía mediante la producción de biogás. Por ello, la digestión anaerobia podría definirse, a priori, como una de las tecnologías más beneficiosas para el medio ambiente y más eficientes energéticamente (Merlin Christy et al., 2014; Robles et al., 2020).

1.1.1 Tratamientos anaerobios para aguas residuales de baja carga

El tratamiento anaerobio se ha aplicado a las aguas residuales domésticas desde hace décadas. Entre los sistemas empleados destacan las fosas sépticas, digestores anaerobios, tanques Imhoff o lagunas de estabilización, entre otros (Khan et al., 2011). Estos procesos requieren un área de implantación elevada y admiten velocidades de

carga orgánica (VCO) muy bajas con tiempos de retención hidráulica (TRH) muy altos. En la mayoría de estos sistemas de baja carga, no se hacen distinciones entre el tiempo de retención celular (TRC) con respecto al tiempo de retención hidráulica (TRH), operando con el mismo valor para ambas variables (Engida et al., 2020). Este factor fue la causa principal para que estas tecnologías anaerobias no se desarrollasen con mayor éxito. La implantación de tratamientos anaerobios de aguas residuales de baja carga, se vio afectada por limitaciones asociadas a los elevados períodos de puesta en marcha necesario para desarrollar la cantidad de biomasa requerida en el reactor, la sensibilidad a sustancias tóxicas y la baja calidad del efluente obtenido (Srinivasa Raghavan et al., 2017).

Sin embargo, gracias al desarrollo de los reactores anaerobios de alta carga (reactores con TRC independiente del TRH como los filtros anaerobios y los procesos de contacto anaerobio), sumado al objetivo de lograr procesos de tratamiento anaerobio de bajo coste, con un efluente alta calidad y una alta reducción del consumo de energía, se impulsó una investigación centrada en los procesos anaerobios para aguas residuales de baja carga (Srinivasa Raghavan et al., 2017).

1.1.2 Sistemas de manto de lodo anaerobio de flujo ascendente (UASB) para el tratamiento de aguas residuales domésticas

El sistema UASB fue desarrollado en la década de 1970 por Lettinga et al. (Lettinga et al., 1980). En la década de 1980, se valora la aplicabilidad de los sistemas UASB para el tratamiento de aguas residuales urbanas, donde los resultados indicaron que se puede lograr eliminar en aproximadamente el 70% de la demanda química de oxígeno (DQO) en regiones con clima tropical (Khan et al., 2011). En la actualidad, los reactores UASB se consideran una tecnología sostenible y con una base sólida para el tratamiento de un amplio abanico de aguas residuales biodegradables, incluidas las aguas residuales urbanas (Centeno-Mora et al., 2020; Engida et al., 2020).

El sistema más elemental de sistema UASB consta de un depósito cilíndrico o rectangular en el que se introduce, por su parte inferior, el agua residual a tratar. Esta avanzará en sentido ascendente pasando a través de un manto de lodos, con biomasa granular o floculenta, que se ha formado en la parte inferior del sistema. Es en este manto donde se realiza el proceso de transformación anaerobia de la materia orgánica. Un aspecto clave de este tipo de sistemas es el desarrollo de biomasa granular o

floculenta con buenas características de sedimentabilidad, permitiendo una fácil separación del lodo del efluente y posibilitando operar con distintos tiempo de residencia hidráulico (TRH) y tiempo de retención celular (Mainardis et al., 2020). Además, resulta de especial importancia la presencia de un separador sólido-líquido-gas en la parte superior del sistema UASB, correctamente diseñado, que evite el arrastre de burbujas y sólidos en suspensión hacia la zona de salida superior, lo que empeoraría la calidad del efluente depurado (dos Santos et al., 2016). Para un correcto funcionamiento de los reactores UASB, la velocidad de flujo ascendente debe estar en un rango de $0,02-0,53 \text{ m h}^{-1}$ y los valores de TRH en un rango de entre 4 y 24 h (Wang, 2021).

1.1.3 Ventajas de los sistemas UASB frente a procesos aerobios

El uso de los sistemas UASB ofrece una serie de ventajas frente a otras tecnologías, relacionadas con los esfuerzos por impulsar la sostenibilidad, la autosuficiencia energética y la economía circular en el ámbito del tratamiento de aguas residuales. Dichas ventajas están basadas en una baja complejidad y costes operativos, la eficiencia energética (el biogás producido se puede utilizar como energía) y la baja producción de lodos (Centeno-Mora et al., 2020).

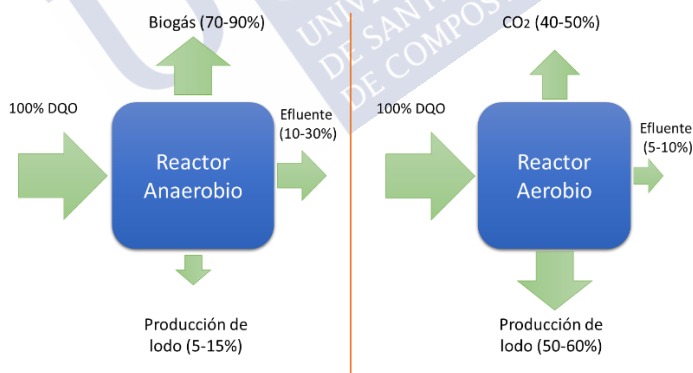


Figura 1.1. Representación esquemática de la conversión de la DQO en sendos sistemas anaerobio y aerobio (Von Sperling and De lemos Chernicharo, 2005).

Baja producción de lodos

El proceso de conversión de materia orgánica a través de la digestión anaerobia se lleva a cabo por comunidades microbianas complejas, donde la degradación

completa a metano requiere la acción en sociedad y secuencial de varios grupos tróficos diferentes (Mchugh et al., 2004). Estas comunidades microbianas, de acuerdo con su metabolismo, ofrecen un bajo rendimiento en la producción de lodos frente a metabolismos como el aerobio, el cual tiene un rendimiento aparente de lodo relativamente alto con un rango entre 0,35-0,45 kg SSV kg⁻¹ DQO, siendo al menos 3 veces superior al señalado para el tratamiento anaerobio, con valores de 0,05-0,15 kg SSV kg⁻¹ DQO (Khanal, 2008). Esta característica es una de las más importantes, que justifica que el tratamiento anaerobio presente menores costes de operación (OPEX) que una alternativa puramente aerobia.

Tecnología compacta

El diseño y la configuración de un sistema UASB ofrece ventajas operativas y de instalación significativas frente a sistemas como los lodos activos. Un sistema UASB es un sistema compacto que permite llevar cabo diferentes procesos en una sola unidad de tratamiento, lo que se traduce en la combinación de 3 o más componentes en una sola unidad. Gracias a la existencia en diseño del separador trifásico (sólido-líquido-gas) los reactores UASB pueden operar como un tratamiento secundario donde se presenta la reacción biológica, la estabilización de la biomasa, el proceso de sedimentación y clarificación del efluente, así como la separación y recolección del biogás producido (Van Lier et al., 2010). Esto se traduce en una disminución de los costes de inversión de la instalación de tratamiento (CAPEX) así con un ahorro significativo de espacio que se precisa para implantar un sistema de depuración.

Eficiencia energética

La autosuficiencia energética es un aspecto que ha generado interés en el ámbito del tratamiento de las aguas residuales a fin de reducir sus costes totales de operación (OPEX), disminuyendo el consumo externo de energía, y su huella de carbono (Kor-Bicakci and Eskicioglu, 2019). Por otra parte la creciente preocupación en la reducción de emisiones de CO₂, derivadas del uso de combustibles fósiles, como el petróleo crudo y el gas natural, han aumentado el interés por fuentes de energía alternativas renovables, como el biogás generado en el tratamiento de residuos sólidos y líquidos (Sevillano et al., 2021).

El proceso de digestión anaerobia se considera una tecnología económica, gracias a su baja demanda energética, capaz de generar un recurso energético renovable gracias a la obtención de biogás en la transformación biológica de los sustratos, que habitualmente son de origen natural. El biogás enriquecido con metano puede quemarse para generar electricidad y/o energía térmica, o convertirse en gas renovable para inyectar a redes de gas natural, o uso como combustible de automóviles lo que ofrece importantes beneficios: I) proporciona una energía respetuosa con el medio ambiente; II) reduce la dependencia energética de los combustibles fósiles y las emisiones de gases de efecto invernadero (Kor-Bicakci and Eskicioglu, 2019); III) aborda la crisis actual de gestión de residuos sólidos y líquidos (Chernicharo et al., 2015; Sevillano et al., 2021).

Sin embargo, para lograr la autosuficiencia energética en las plantas de tratamiento de aguas residuales, la generación total de energía obtenida a través de los procesos de tratamiento debería ser capaz de satisfacer la demanda total de energía para el tratamiento de aguas residuales y los lodos generados (Kor-Bicakci and Eskicioglu, 2019). En la actualidad, este objetivo sigue siendo un desafío. Algunos sistemas UASB, como los implementados en India, utilizan el biogás generado como combustible para la generación de energía (Chernicharo et al., 2015), la cual puede cubrir un porcentaje de la demanda energética de la planta. Pero, desafortunadamente, la recuperación de biogás es todavía un elemento en desarrollo en muchas de las aplicaciones de los sistemas UASB, tanto en pequeña como a grande escala, donde el biogás se quema o se libera directamente a la atmósfera (Chernicharo et al., 2015).

Bajos costes y complejidad operativa

En las últimas décadas las tecnologías anaerobias se han posicionado como uno de los sistemas más rentables para el tratamiento de aguas residuales (Azevedo et al., 2021). En particular, los reactores UASB representan una opción apropiada y sostenible para aquellos países en desarrollo y de clima cálido, como en América Latina e India, para los cuales la simplicidad operativa y la rentabilidad son los principales factores que afectan a la selección de la tecnología de tratamiento de aguas residuales (Centeno-Mora et al., 2020).

1.1.4 Desventajas de los sistemas UASB frente a procesos aerobios

A pesar de este éxito de los reactores UASB, estos presentan tiempos de puesta en marcha elevados, y requisitos estrictos de manipulación de biogás, lodos purgados o efluentes tratados para evitar la dispersión de malos olores. Por lo general, los efluentes generados no alcanzan los límites de vertido señalados en la normativa y no se pueden verter directamente a las masas de aguas receptoras. Esto es debido a que el efluente anaerobio contiene prácticamente la totalidad de nutrientes del agua bruta, principalmente en forma de amonio y fosfato, sulfuro disuelto, metano disuelto, materia orgánica residual disuelta y en suspensión y patógenos (Azevedo et al., 2021; Engida et al., 2020; Mai et al., 2018). Los efluentes de sistemas anaerobios se caracterizan por tener concentraciones de DQO hasta 200 mg L^{-1} , DBO₅ hasta 150 mg L^{-1} , SST hasta 100 mg L^{-1} , amonio entre 30 y 80 mg N L^{-1} , y fósforo hasta 20 mg P L^{-1} (Chernicharo, 2006; Foresti et al., 2006; Khan et al., 2011), por lo que se precisa un postratamiento para reducir la presencia de contaminantes del agua por debajo de los límites de vertido.

A continuación, se analizan los principales factores que afectan al rendimiento de los sistemas anaerobios, analizando posteriormente alternativas de postratamiento de los efluentes.

Limitaciones en la degradación de materia orgánica

La temperatura se considera como uno de los principales factores que limitan la aplicación de procesos anaerobios en regiones con clima moderado, ya que valores de temperatura bajos afectan negativamente a los procesos metanogénicos y la hidrólisis de materiales orgánicos. En condiciones psicrófilas, a baja temperatura, las reacciones biológicas se llevan a cabo a una velocidad menor que en condiciones mesófilas. En estos casos, la mayoría de las reacciones de biodegradación de materia orgánica requieren más energía para completarse que a una temperatura óptima de $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (Lettinga et al., 2001). Desde esta perspectiva, el tratamiento de aguas residuales a baja temperatura sigue siendo un desafío desde un punto de vista energético. Adicionalmente, la disminución de la temperatura cambia las propiedades físicas y químicas de las aguas residuales domésticas y, posteriormente, afecta el rendimiento del reactor, aumentando por otra parte la concentración de metano disuelto en el efluente del sistema (Wang, 2021).

Metano disuelto

Las emisiones difusas de metano disuelto (CH_4) en el efluente líquido de los reactores anaerobios, en especial los UASB, han despertado el interés de la comunidad científica en los últimos años. El metano se recupera en la fase gas a través del biogás, variando su composición entre 70 al 80% (Chernicharo et al., 2015), debido a su baja solubilidad en agua. No obstante, investigadores han observado concentraciones disueltas en el efluente que oscilan entre de 10 a 25 mg L^{-1} (Centeno-Mora et al., 2020; Silva-Teira et al., 2017). Estas concentraciones de metano en los efluentes tratados podrían aumentar en función de la temperatura, donde a menor temperatura es posible encontrar una mayor solubilidad del gas (Wang, 2021).

El metano disuelto se desprende fácilmente de los efluentes, por simple movimiento del agua a través de las estructuras hidráulicas, en el paso del efluente a otra unidad de postratamiento o por la liberación directa al medio ambiente. La presencia de metano disuelto es un inconveniente importante en la aplicación de los sistemas anaerobios, debido a que este gas puede ser emitido fácilmente a la atmósfera aumentando las emisiones de gases de efecto invernadero, con una pérdida significativa de energía potencialmente recuperable (Centeno-Mora et al., 2020). Por tanto, el control y la recuperación del metano liberado a la atmósfera es un factor importante, en aras de potenciar la sostenibilidad y competitividad de las tecnologías anaerobias en el tratamiento de aguas residuales.

Sulfuro de hidrógeno

Al igual que en el caso del metano, es frecuente encontrar emisiones difusas de sulfuro de hidrógeno (H_2S) debido a su presencia en el efluente líquido de los reactores anaerobios. El H_2S es un compuesto que se genera en sistemas anaerobios debido a la presencia de compuestos de azufre en el agua residual. Este azufre es reducido a H_2S mediante la acción de bacterias sulfato-reductoras (SRB), las cuales utilizan la materia orgánica como dador de electrones. Las concentraciones disueltas observadas para el H_2S suelen oscilar de 6 a 15 mg L^{-1} (Centeno-Mora et al., 2020). Las emisiones de H_2S son otro inconveniente importante en la aplicación de los sistemas anaerobios debido a que, tras abandonar el sistema UASB en el efluente, estos son emitidos a la atmósfera provocando molestias por olores y corrosión (Centeno-Mora et al., 2020), e incluso dichas concentraciones H_2S , pueden afectar o inhibir los procesos biológicos empleados en postratamientos del efluente anaerobio.

El H_2S es un gas tóxico cuya incidencia sobre la salud dependerá del tiempo de exposición y de la concentración en que se encuentra. La exposición puede producir dolor de cabeza, fatiga, mareos, andar tambaleante y diarrea, entre otros (Sax and Lewis, 1989). Unas concentraciones elevadas de exposición pueden provocar incluso la muerte.

1.2 ALTERNATIVAS PARA EL POSTRATAMIENTO DE EFLUENTES DE SISTEMAS UASB

Los efluentes de sistemas UASB deben cumplir con la normativa de descarga o reutilización establecida por los organismos ambientales competentes, para prevenir la contaminación de las masas de agua receptoras. Los sistemas UASB no suelen alcanzar los valores establecidos, pero pueden emplearse como una primera etapa que elimina principalmente materia orgánica, seguidos de un postratamiento del efluente. El objetivo de este postratamiento de sistemas UASB es alcanzar completa de materia orgánica, nutrientes, compuestos inorgánicos reducidos como sulfuros, y organismos patógenos.

En los últimos años se han realizado avances en los sistemas de postratamiento de efluentes de sistemas UASB, obteniendo buenos resultados en cuanto a los parámetros de vertido establecidos y además logrando recuperar recursos como nitrógeno, fósforo o metano disuelto (Khan et al., 2011; D. T. Mai et al., 2018). Los sistemas comúnmente empleados para eliminar materia orgánica, sólidos en suspensión, así como una fracción de amonio o nitrógeno, son lagunas de maduración, humedales artificiales, lagunas aerobias, sistemas de lodos activos, biorreactores discontinuos secuenciales (SBR), filtros percoladores, biofiltros sumergidos aerobios y sistemas de flotación por aire disuelto (DAF).

UASB-Laguna de maduración

La combinación de sistema UASB con un postratamiento mediante laguna de maduración se usa para mejorar la calidad de los efluentes anaerobios como los obtenidos en sistemas UASB y alcanzar los requisitos legales, disminuyendo la cantidad de materia orgánica y sólidos en suspensión presentes en el agua tratada anaeróbicamente, permitiendo reducir la presencia de coliformes fecales (Cavalcanti et al., 2001). Estos sistemas se emplean de manera extendida en países en desarrollo, como Brasil, china o India (Khan et al., 2011). Estos sistemas se operan con TRH

elevados, en torno a 15 días, para obtener las eficacias de eliminación de DQO, SST y DBO deseadas. Cuanto mayor sea la concentración de estos elementos en el efluente del sistema UASB, mayor será el TRH necesario. Sin embargo, se necesitan TRH más bajos que los anteriores para eliminar de coliformes fecales. En un estudio realizado con agua residual real en Brasil, Sperling et al. (2005) obtuvieron una eliminación casi completa de coliformes fecales, con valores de nitrógeno total menores a 10 mg N L^{-1} , amonio 7 mg N L^{-1} , fósforo 3 mg P L^{-1} , DQO $170 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$, y DBO $44 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$ empleando 4 lagunas de maduración con un TRH de 1,4-2,5 días en cada una.

UASB-Humedales artificiales

El uso de humedales artificiales se presenta como una alternativa técnica y económicamente factible para poblaciones pequeñas (De Sousa et al., 2001), quien demostró su viabilidad para la eliminación de DQO, SST, nutrientes y coliforme fecales en una planta situada en Brasil con humedales artificiales de 10 m de largo y 1 m de ancho, en los que emplearon plantas macrófitas (*Juncus sp.*). Las eficiencias de eliminación mayores se obtuvieron con un TRH de 10 d, alcanzando más del 80% de eliminación para nitrógeno, fósforo, materia orgánica y SST.

UASB-Filtros percoladores

Los filtros percoladores son biorreactores trifásicos, que consisten en un lecho fijo de rocas, grava, espumas de poliuretano, turba o soportes plásticos sobre los que se esparce (percola) el agua residual, manteniendo un flujo descendente en contacto con aire. En estos sistemas se mantiene un ambiente aerobio mediante difusión de oxígeno por aire forzado o por convección natural. En los medios de soporte mencionados se forma una biopelícula adherida en la que se producen diversas reacciones biológicas. Es un sistema simple, fácil de operar y robusto dentro de sus limitaciones, que pueden operarse con TRH más bajos que los sistemas de lodos activos. Los valores en el efluente final de DQO pueden estar por debajo de $100 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$, mientras que la concentración de DBO no supera los $60 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$ y la de SST los 30 mg L^{-1} (Chernicharo and Nascimento, 2001).

UASB-Biofiltros sumergidos aerobios

Los biofiltros sumergidos aerobios se componen de partículas de un medio poroso orgánico u inorgánico, donde el agua residual y el aire circulan desde el fondo

del reactor, manteniendo habitualmente flujo ascendente, aunque existen biofiltros donde el agua residual puede entrar también en sentido ascendente. La biopelícula formada sobre el filtro es el principal mecanismo que elimina la materia orgánica soluble y los SST, dado que el material granular sirve tanto como soporte de crecimiento para microorganismos, como filtro para sólidos. Los TRH aplicados a estos filtros son bajos, incluso 0,5 h, y las eficacias de eliminación de DQO, DBO y SST elevadas, 88, 95 y 95%, respectivamente (Gonçalves et al., 1999).

UASB-Sistemas de flotación por aire disuelto (DAF)

Mediante postratamientos que consisten en flotación por aire disuelto (DAF) se elimina principalmente aceites, grasas, material coloidal y sólidos en suspensión presentes en el efluente. Este proceso emplea un coagulante, normalmente sales de hierro o aluminio (Prakash et al., 2007), y un floculante para mejorar la separación de los sólidos en suspensión y flóculos del agua residual. Mediante la introducción de una corriente de agua con aire sobresaturado se fomenta la formación de microburbujas en la cámara de reacción de los DAF, y se induce la flotación de grasas, aceites y sólidos en suspensión al adherirse las microburbujas generadas a las partículas de estos materiales, lo que provoca que esos residuos se acumulen en la superficie y se eliminan mediante rasquetas superficiales. Este sistema tienen un coste operacional elevado debido al uso de productos químicos, coagulante y floculante, pero permite eliminar, principalmente, grandes cantidades de materia orgánica y sólidos en suspensión y fósforo, con eficacias de eliminación por debajo del 90%, 95% y 86%, respectivamente (Khan et al., 2011).

UASB-Sistemas de lodos activos

Este postratamiento consiste en la aireación continua del efluente del UASB en un reactor biológico de lodos activos. Von Sperling et al (2001) concluyo que, en vista a las eficiencias de eliminación de DQO y amonio, y a los TRH globales de 7,9 h, la configuración UASB-lodos activos es la mejor alternativa para aquellas regiones con clima cálido, debido a las ventajas que supone en términos de ahorro de energía y la posibilidad de espesar y digerir el lodo aerobio en exceso en el propio UASB.

UASB-Biorreactores discontinuos secuenciales (SBR)

Este tratamiento se basa en la utilización de sistemas SBR, una modificación del sistema de lodos activos, en la que las reacciones biológicas y la etapa de decantación se efectúan en el mismo recipiente a lo largo del tiempo, operándose por ciclos. Las fases de operación son: llenado (continuo o habitualmente intermitente) del SBR con agua residual bruta, etapa de aireación en la que se promuevan las conversiones biológicas aerobias, etapa de decantación en la que se separa el lodo del agua clarificada y vaciado del agua tratada. Las purgas de lodo suelen realizarse con el lodo decantado. Los sistemas SBR pueden alcanzar eliminaciones elevadas de DQO, DBO y SST, similares a las obtenidas por sistemas de lodos activos (Moawad et al., 2009) en sistemas compactos, carentes de clarificador secundario, por lo que se suelen usar para el tratamiento de aguas residuales de pequeños núcleos o industrias que generen un caudal pequeño de agua residual.

UASB-Biorreactor de membrana aerobio

El Biorreactor de membrana aerobio (MBR) es una modificación del sistema de lodos activos, en la que se reemplaza la unidad de clarificación secundaria por una unidad de filtración de membranas. Mediante el empleo de una membrana física, comúnmente empleadas ultrafiltración, el sistema es capaz de separar la fase líquida de los sólidos en suspensión. El uso de membranas permite obtener efluentes de alta calidad con un bajo contenido en materia orgánica y un efluente libre de sólidos y patógenos, lo que facilita la aplicación del agua depurada destinada a reúso, como riego agrícola u operaciones de limpieza. Además, esta tecnología está considerada como una de las Mejores Técnicas Disponibles (MTD) cuando se trata de reutilizar el agua tratada para darle un uso posterior diferente a la descarga a una masa de agua. La retención completa de sólidos permite arranques más rápidos y por tanto la obtención de eficacias de eliminación elevadas en un menor período de tiempo. En los últimos años se ha incrementado el número de plantas con MBR a escala real en Europa, USA y China. las plantas de tratamiento más grandes que disponen de esta tecnología pueden tratar entre 100.000 y 864.000 m³ d⁻¹ (Xiao et al., 2019). El biorreactor de membrana ha sido propuesto como postratamiento de efluentes de sistemas UASB que operan a temperatura ambiente tratando aguas residuales de baja carga (Buntner et al., 2013), presentando una tolerancia elevada frente a variaciones de temperatura y carga orgánica y obteniendo una tasa de crecimiento celular global similar a las propias para sistemas anaerobios.

Tecnología SIAM

La “Universidad de Santiago de Compostela” ha desarrollado un proceso que ha patentado, denominado Sistema Integrado Anaerobio metanogénico biorreactor de Membranas (SIAM) en el que el efluente de un reactor UASB recibe un postratamiento mediante un biorreactor híbrido de membrana (MBR) preanóxico (patente española ES2401445B2 y en EE.UU. US9725345B2). Las primeras investigaciones con esta tecnología datan de los años 2012-2013, en los que un efluente de un sistema UASB con concentraciones de metano disuelto comprendidas entre 19 y 25 mg L⁻¹ fueron tratadas en un MBR híbrido con una primera cámara preanóxica. De estas primeras investigaciones se observó que el porcentaje de recirculación (R) entre la cámara de membranas y la cámara anóxica tenían un impacto en la eliminación tanto de metano disuelto como de nitrógeno total, observando una mejora de la eliminación a R bajos de 1,0, en los que se obtuvieron eliminaciones de metano disuelto de un 80%, mientras las eliminaciones observadas de NT alcanzaban unos 23 mg L⁻¹ en dichas condiciones ((Sánchez et al., 2016). Los análisis FISH del lodo del MBR mostraron la presencia de una población de gran diversidad en la que predominaban microorganismos metanótrofos aerobios, pero donde también se detectaron bacteria del filo NC10 (al que pertenecen los metanótrofos anaerobios) y bacterias anammox. En un segundo estudio con el proceso SIAM, años 2013-2014, se logró avanzar más en el conocimiento del proceso, logrando también una eliminación del 80% de metano disuelto y eliminaciones de NT de unos 15-20 mg L⁻¹, detectando mediante ensayos de actividad, que una fracción del NT se eliminaba en condiciones anaerobias, con el metano disuelto presente (Silva-Teira et al., 2017). Una de las grandes diferencias con respecto al estudio previo fue la determinación de un nuevo porcentaje de recirculación R óptimo, de 3,0 diferente al hallado previamente por Sánchez et al. (2016). Analizando los datos de ambos experimentos presencia elevada de DQO total en el primer estudio realizado, lo cual pudo afectar al proceso de oxidación de metano, limitándolo a mayores valores de R. Añadir que en el estudio de Silva-Teira et al (2017) la DQO soluble del efluente del UASB fue de 35±19 mg L⁻¹, menor a la citada por Sánchez et al. (2016) de 57±35 mg L⁻¹, lo cual explicaría los mejores resultados de eliminación de NT del primer estudio. El tercer estudio realizado desde el final del año 2014 a mediados de 2016 se llevó a cabo añadiendo nitrito a la cámara anóxica del MBR (Alvarino et al., 2019), compuesto observado en muy pequeña concentración en los estudios previos por la oxidación completa del ion amonio a nitrato, logrando eliminaciones de NT de unos 35 mg L⁻¹ y no observando ningún impacto de la presencia de nitrito en la eliminación

de metano disuelto, que se mantuvo en el 80%. Los tres estudios se realizaron en un sistema MBR compuesto por un primer compartimento anóxico con presencia de biopelícula, y un compartimento aerobio de filtración.

1.3 ELIMINACIÓN DE NITRÓGENO

Debido a que los sistemas UASB que se emplean actualmente se suelen ubicar en lugares donde no está regulada la eliminación de nitrógeno, los postratamientos empleados tienden a ser fisicoquímicos o aerobios. Sin embargo, estos tratamientos no llevan a cabo eliminación de nitrógeno. De cara a implantar los sistemas UASB en regiones con límites estrictos de vertido de nitrógeno, se deberán emplear postratamientos que permitan llevar a cabo alguna de las vías de eliminación biológica de nitrógeno, entre ellas la desnitrificación heterótrofa convencional, desnitrificación empleando compuestos de azufre en aguas que contengan este compuesto, o el proceso anammox.

Eliminación de nitrógeno por desnitrificación heterótrofa convencional

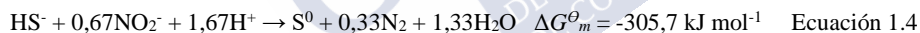
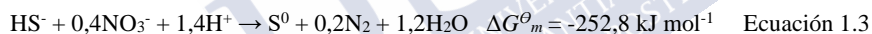
El proceso más común para llevar a cabo la eliminación biológica de nitrógeno, empleado en sistemas basados en lodos activos convencionales. En primer lugar, las bacterias amonio oxidantes (AOB) y las nitrito oxidantes (NOB) llevan a cabo un proceso de nitrificación autótrofa en presencia de oxígeno como aceptor de electrones, oxidando amonio (NH_4^+) hasta nitrito (NO_2^-) y nitrato (NO_3^-), respectivamente (Pelaz et al., 2017). El proceso se completa con la desnitrificación heterótrofa, en ambientes anóxicos, del nitrito o nitrato producidos, reduciéndose hasta nitrógeno gas (N_2) según la secuencia $\text{NO}_3^- - \text{NO}_2^- - \text{NO} - \text{N}_2\text{O} - \text{N}_2$. Esta reducción se lleva a cabo por bacterias desnitrificantes heterótrofas, que usan materia orgánica biodegradable como dador de electrones. Si la secuencia se interrumpe antes de completarse, se pueden emitir NO y NO_2 , que contribuyen al fenómeno de smog y a la emisión de GEI.

Por tanto, para que este proceso se pueda realizar, la relación C/N no puede ser baja, de lo contrario sería necesario aportar una fuente externa de materia orgánica al proceso, normalmente etanol o metanol por ser de las más económicas. Relaciones de C/N bajas implican que el proceso de desnitrificación estaría limitado por la falta de materia orgánica biodegradable (Ruscalleda Beylier et al., 2011). Ello supone que para los efluentes de sistemas UASB que presenten una relación baja C/N no será posible realizar la eliminación de nitrógeno por esta vía sin el impacto negativo que

supone el coste extra de la fuente externa de materia orgánica, lo que perjudica la viabilidad de estos sistemas atendiendo a aspectos económicos y de sostenibilidad. Ello hace necesario buscar otras alternativas biológicas de eliminación de nitrógeno.

Eliminación de nitrógeno empleando compuestos de azufre

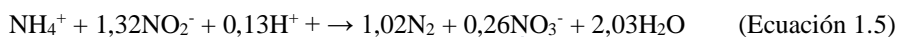
La desnitrificación autótrofa con compuestos reducidos de azufre se presenta como una alternativa económica para contribuir a la eficacia de desnitrificación de un proceso de tratamiento de aguas residuales. Los microorganismos implicados pueden eliminar conjuntamente nitrato o nitrito y sulfuro; además, pueden emplear otros dadores de electrones como tiosulfato, o azufre elemental (Manconi et al., 2007). Este proceso es especialmente aplicable como postratamiento de efluentes de reactores anaerobios que traten aguas con presencia de compuestos de azufre. Como ventajas de este proceso están la baja necesidad de nutrientes y un crecimiento de la biomasa bajo.



Las Ecuaciones 1.1 y 1.2 muestran la estequiometría para la oxidación completa de sulfuro de hidrógeno, empleando tanto nitrato como nitrito como aceptores de electrones (Mahmood et al., 2007), mientras las ecuaciones 1.3 y 1.4 muestran las la oxidación parcial de sulfuro a azufre elemental (Jing et al., 2010). Las reacciones de la oxidación completa de sulfuro son más favorables que la oxidación parcial, pero otros autores han señalado que puede tener lugar la formación de azufre elemental especialmente cuando el aceptor de electrones es el nitrato (Mahmood et al., 2008; Reyes-Avila et al., 2004), o cuando hay exceso de ambos aceptores de electrones (Moraes et al., 2012). Sin embargo, en el caso de limitación de sulfuro en el sistema, es habitual la reducción de nitrato a nitrito como consecuencia de la cinética más rápida de la reacción.

Nitritación parcial y anammox

En el proceso anammox se llevan a cabo por bacterias anammox, en condiciones anaerobias, la oxidación de amonio y la reducción de nitrito (Pedrouso et al., 2018; Strous et al., 1999). Existen casos reales de aplicación de sistemas de nitritación parcial y Anammox se aplican para el tratamiento a escala real de efluentes de digestores anaerobios, cuyo contenido en amonio es elevado, con valores superiores a 700 mg N L^{-1} , y que presentan contenidos de materia orgánica bajos (van der Star et al., 2007). Actualmente existen unas 200 instalaciones de tratamiento de aguas residuales domésticas en las que está presente el proceso anammox (Cao et al., 2017).



La combinación de estos procesos presenta una serie de ventajas frente al proceso de desnitrificación convencional respecto a procesos de nitrificación-desnitrificación convencionales: reducción de un 60% del consumo de energía para aireación, dado que solo se necesita oxidar una fracción de amonio a nitrito; menores emisiones de CO_2 por el menor consumo energético y por ser organismos autótrofos; y una menor producción de lodos (Fux and Siegrist, 2004). A través del proceso anammox es posible eliminar el 90% del nitrógeno inorgánico total como NH_4^+ y NO_2^- dejando una fracción de nitrógeno del 10% en el efluente en forma de NO_3^- (Wang et al., 2021) de acuerdo con la Ecuación 1.5. El proceso anammox presenta unas velocidades de eliminación de nitrógeno elevadas en corrientes secundarias a temperaturas de 35°C , como los efluentes de digestores anaerobios presentes en sistemas de tratamiento de agua residual real, que van desde 1 a $3 \text{ g N L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ (Ruscalleda Beylier et al., 2011). La aplicación de procesos anammox en la línea principal de agua está en fase de desarrollo y validación. Se han obtenido eliminaciones altas de nitrógeno de hasta $550 \text{ mg NT L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, pero se obtiene un efluente con nitrógeno residual debido a la formación de nitrato durante el proceso anammox. Además, las menores temperaturas de operación en esta corriente, entre 10 y 20°C , que dificultan la nitrificación parcial (Díaz et al., 2020; Kim et al., 2008; Pedrouso et al., 2018), y las bajas concentraciones de nitrógeno respecto a corrientes secundarias, hacen que el proceso anammox sea poco viable técnicamente como único tratamiento biológico de eliminación de nitrógeno a escala real (Xie et al., 2017).

1.4 ELIMINACIÓN DE FÓSFORO

El fósforo es un compuesto presente en aguas residuales urbanas en concentraciones comprendidas entre 4 y 12 mg $\text{PO}_4^{3-}\text{-P L}^{-1}$ (Metcalf&Eddy et al., 2014) y del que no se espera una eliminación destacada mediante el uso de sistemas biológicos anaerobios metanogénicos. Las principales vías de eliminación de este compuesto son la eliminación biológica de fósforo, llevada a cabo por organismos acumuladores de fósforo (PAO), y la precipitación química.

Los organismos PAO incorporan el fósforo a su célula, eliminándose del sistema de tratamiento en las purgas de lodo. Esto supone un ahorro significativo frente a las precipitaciones químicas de fósforo en términos de costes de operación, una producción de lodo, y un menor impacto en cuanto a la salinidad aportada por los productos químicos empleados (Blackall et al., 2002). Para ello, se debe diseñar el sistema de tratamiento con una etapa anaerobia previa al sistema de tratamiento anóxico/aerobio, que tenga un TRH bajo, de 0,5-1 horas, por lo que el volumen de esta etapa suele ser del 5% del volumen total. Sin embargo, para que la eliminación biológica de fósforo sea efectiva, la relación DQO/P debe ser mayor de 35 g DQO g⁻¹ P (Centre European d'Etudes des Polyphosphates, 2001), de lo contrario se debe recurrir a procesos de precipitación química para alcanzar los límites de vertido establecidos.

Los tratamientos de precipitación química se pueden realizar en el tratamiento primario (pre-precipitación), en el tratamiento secundario (precipitación simultánea), o añadir una etapa de afino del efluente final (post-precipitación). Los agentes químicos para la precipitación más comunes son las sales de aluminio o hierro (Chernicharo et al., 2015). En menor medida se emplean calcio, normalmente en forma de hidróxido de calcio, para precipitar fosfato de calcio, o sales de magnesio, para obtener estruvita (Crutchik and Garrido, 2011; Liu et al., 2013).

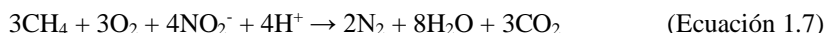
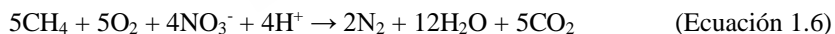
1.5 ELIMINACIÓN CONJUNTA DE METANO Y NITRÓGENO

Con la eliminación de nutrientes de efluentes de sistemas UASB se reduce uno de sus impactos negativos. Sin embargo, el problema derivado de la presencia de metano disuelto en estos efluentes sigue presente. El metano se produce en aquellas plantas que tienen sistemas anaerobios en la línea principal y puede ser una alternativa interesante en aquellos efluentes de sistemas UASB que presenten una baja relación

C/N, puesto que se podría emplear como una fuente de carbono de bajo coste para el proceso de desnitrificación, evitando el aporte de una fuente externa de DQO. El uso del metano disuelto presente en efluentes de sistemas UASB en postratamientos presenta 3 ventajas inmediatas: disminución de las emisiones de GEI, evitando la emisión a la atmósfera de metano; abaratamiento del coste de eliminación de nitrógeno, evitando o disminuyendo el uso de fuentes externas de carbono; y se reducen la presencia de nitrógeno en el efluente final. Entre los procesos biológicos de eliminación conjunta de metano y nitrógeno destacan la oxidación aerobia de metano acoplada a desnitrificación y la oxidación anaerobia de metano dependiente de nitrito/nitrato.

Oxidación aerobia de metano unida a desnitrificación (AMO-D)

El proceso de oxidación aerobia de metano unido a desnitrificación se lleva a cabo por la colaboración entre metanótrofos aerobios y la presencia de desnitrificantes heterótrofos en el medio (Thalasso et al., 1997). Es un proceso de enriquecimiento rápido y factible operacionalmente, más sencillo que los procesos anaerobios. Los metanótrofos aerobios son los responsables de la oxidación de metano a productos intermedios de oxidación como metanol (Mechsner and Hamer, 1985), formaldehído (Liu et al., 2014) o acetato (Costa et al., 2000); los desnitrificantes heterótrofos emplean estos compuestos orgánicos como dadores de electrones para la desnitrificación, empleando como aceptores de electrones nitrato (Ecuación 1.6) o nitrito (Ecuación 1.7). Los organismos desnitrificantes son sensibles al oxígeno, por lo que la eficiencia de este proceso puede incrementarse aplicando relaciones O_2/CH_4 bajas (Xu et al., 2020).



Oxidación anaerobia de metano: microorganismos n-damo.

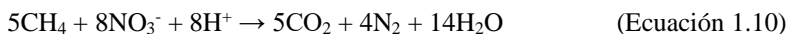
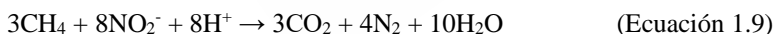
Existe una vía de eliminación biológica de metano más eficiente que la anterior, en términos de eliminación de nitrógeno, puesto que estequiométricamente se puede eliminar más nitrógeno con la misma cantidad de metano. Esta vía es la oxidación anaerobia de metano dependiente de nitrato/nitrito, proceso n-damo. La posibilidad de llevar a cabo esta ruta de eliminación conjunta de metano y nitrógeno se confirmó por primera vez en medios con ausencia completa de oxígeno por Raghoebarsing et

al. (2006), poniendo de manifiesto que este proceso puede contribuir significativamente en el ciclo biológico de metano y nitrógeno. El consorcio involucrado en el proceso n-damo está formado por 2 microorganismos: n-damo bacteria y n-damo arquea.

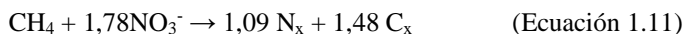
Las arqueas involucradas en el proceso n-damo se denominan *Candidatus Methanoperedens nitroreducens* (Haroon et al., 2013). Estos microorganismos son capaces de oxidar metano a CO₂ mientras reducen nitrato a nitrito en ambientes anaerobios mediante metanogénesis reversa (Ecuación 1.8). Estos organismos pertenecen a las arqueas ANME-2d, que emplean metano como fuente de carbono principal, y carbono inorgánico disuelto en proporciones bajas con respecto al metano (Kurth et al., 2019).



Entre las bacterias que se encargan de oxidar de forma anaerobia el metano, pertenecientes al filo candidato NC10, están *Candidatus Methyloirabilis Oxyfera*, *Candidatus Methyloirabilis sínica*, y *Candidatus Methyloirabilis lanthanidiphila* (Ettwig et al., 2010; He et al., 2016; Versantvoort et al., 2018). Estos microorganismos oxidan el metano a CO₂ mientras reducen al mismo tiempo nitrito a nitrógeno gas (Ecuación 1.9). Si se tuviese en cuenta el ciclo completo de eliminación de nitrógeno de ambos microorganismos empleando nitrato como aceptor de electrones primario, la reacción resultante se muestra en la Ecuación 1.10.



Existe una ruta de desnitrificación descubierta recientemente que, estequiométricamente, es similar a oxidación anaerobia de metano unida a desnitrificación n-damo. Esta ruta puede eliminar metano y nitrógeno en condiciones de limitación de oxígeno, que es el proceso de oxidación hipóxica de metano unida a desnitrificación, proceso HYME-D (Cao et al., 2019). Los microorganismos envueltos, metanótrofos *Methylobacter* y *Methylomonas*, emplean directamente nitrato como aceptor de electrones en vez de oxígeno, para oxidar el metano (Ecuación 1.11).



Los procesos de eliminación de nitrógeno mediante la acción simbiótica de microorganismos heterótrofos convencionales y de oxidación aerobia de metano pueden ser efectivos, pero resultaría difícil eliminar más allá de 14-20 mg L⁻¹ de nitrógeno de efluentes de sistemas UASB, debido a la estequiometría de la reacción esperada (Ecuación 1.6) y concentración de metano disuelto. Los procesos n-damo descubiertos recientemente se plantean como una alternativa con un alto potencial para alcanzar la eliminación elevada de nitrógeno presente en las aguas residuales, pudiendo llegar a 28-40 mg L⁻¹ de nitrógeno de efluentes de UASB (Ecuación 1.10) disminuyendo los costes operativos en términos de aireación y adición de una fuente de carbono externa. Si a estos factores se suma el uso de metano, un fuerte GEI, como dador de electrones para la desnitrificación, y que estos microorganismos no producen N₂O (Ettwig et al., 2010), se disminuye considerablemente el impacto ambiental asociado al calentamiento global generado por los tratamientos de las aguas residuales que deben eliminar nitrógeno.

En los últimos años se han desarrollado estudios sobre microorganismos n-damo. Kampman et al. (2012) operó un SBR a 30 °C donde obtuvo una velocidad de eliminación de nitrógeno de 37,8 mg NO₂⁻-N L⁻¹ d⁻¹, detectando el lavado de la biomasa durante toda la experimentación y sugiriendo un descenso significativo en el crecimiento del enriquecimiento. Otros estudios con configuraciones SBR obtuvieron velocidades de eliminación de nitrógeno de 40,3 mg NO₂⁻-N L⁻¹ d⁻¹ (Bhattacharjee et al., 2016) y 33 mg NO₂⁻-N L⁻¹ d⁻¹ para n-damo bacteria (Luesken et al., 2011). El lavado de la biomasa, junto con el tiempo de duplicación lento de n-damo bacteria de 1-2 semanas (Ettwig et al., 2010) y las bajas actividades observadas, indicaron la necesidad de avances en el conocimiento de esta tecnología. Tras evaluar diferentes configuraciones de reactores, reactor continuo de tanque agitado (RCTA), reactor discontinuo secuencial (SBR) y reactor air-lift con agitación magnética (MSGLR), Hu et al. (2014) obtuvo los mejores en el MSGLR con una velocidad de eliminación de nitrito de 76,9 mg NO₂⁻-N L⁻¹ d⁻¹, atribuyendo ese resultado a la mejora de la transferencia gas-líquido de metano; sin embargo, también observó la pérdida de biomasa. Para conseguir la retención completa de la biomasa, se llevaron a cabo estudios en biorreactores de membrana (MBR) con recirculación de gas, observando actividades de 37 mg NO₂⁻-N L⁻¹ d⁻¹ (Kampman et al., 2014) y 106 mg NO₂⁻-N L⁻¹ d⁻¹ (Allegue et al., 2018).

De cara a alcanzar mayores velocidades de eliminación de nitrógeno, otros investigadores han llevado a cabo estudios donde se combinan cultivos de n-damo

bacteria y arquea con microorganismos anammox. De esta forma, además de conseguir eliminaciones de nitrógeno mayores, se podría conseguir alcanzar la nitrificación completa que no logra el proceso anammox, pues en torno al 10% del nitrógeno queda en el medio como nitrato, pudiendo ser empleado por n-damo arquea. En este sentido, se alcanzaron velocidades de eliminación de NT de 882 mg NT L⁻¹ d⁻¹ en un reactor de biopelícula de membrana (MBfR) (Cai *et al.*, 2015) o 2497 mg NT L⁻¹ d⁻¹ que empleando un MBR con dos módulos de membrana, el segundo de para fomentar la transferencia gas-líquido de una mezcla de 95% de metano y 5% de dióxido de carbono (MAMBR), atribuyendo la mayor parte de la eliminación de nitrógeno al consorcio n-damo arquea y anammox (Nie *et al.*, 2019).

A pesar de los avances logrados en estudios de laboratorio, resulta complicado alcanzar actividades elevadas y mantenidas en el tiempo, por lo que esta tecnología apenas se está empezando a demostrar para el tratamiento con aguas residuales reales. La primera demostración se realizó tanto en línea principal de agua con agua residual doméstica y en como en línea secundaria para el efluente de la digestión anaerobia (Lim *et al.*, 2021). La tecnología empleada consistió en dos reactores de biopelícula de membrana (MBfR) que combinaron el proceso anammox con el proceso n-damo siguiendo tres rutas técnicas diferentes: 1) nitrificación y MBfR basado en metano; 2) nitrificación parcial y MBfR basado en metano; 3) nitrificación parcial, anammox y MBfR basado en metano. Todas ellas obtuvieron un efluente con NT igual o menor a 5 mg NT L⁻¹ en línea principal de agua, mientras que tratando el efluente de digestión anaerobia eliminó el 96% del nitrógeno del efluente anaerobio parcialmente nitrificado. N-damo arquea dominó el cultivo en ambos reactores, junto con la presencia de anammox y n-damo bacteria. Esto pone de manifiesto que el proceso n-damo sí tiene aplicabilidad para el tratamiento de aguas residuales reales, una vez desarrolladas las tecnologías y parámetros de operación que hagan posible la estabilidad de este proceso en el tiempo.

1.6 BIBLIOGRAFÍA

- Allegue, T., Arias, A., Fernandez-Gonzalez, N., Omil, F., Garrido, J.M., 2018. Enrichment of nitrite-dependent anaerobic methane oxidizing bacteria in a membrane bioreactor. *Chem. Eng. J.* 347, 721–730. <https://doi.org/10.1016/J.CEJ.2018.04.134>
- Alvarino, T., Allegue, T., Fernandez-Gonzalez, N., Suarez, S., Lema, J.M., Garrido, J.M., Omil, F., 2019. Minimization of dissolved methane, nitrogen and organic

- micropollutants emissions of effluents from a methanogenic reactor by using a preanoxic MBR post-treatment system. *Sci. Total Environ.* 671, 165–174. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.169>
- Azevedo, L.S., Bressani-Ribeiro, T., Chernicharo, C.A.L., Araújo, J.C., 2021. Mainstream partial nitrification-anammox as post-treatment of anaerobic effluents under warm climate regions: a critical review of the reported drawbacks. <https://doi.org/10.1080/21622515.2021.1899294>
- Bhattacharjee, A.S., Motlagh, A.M., Jetten, M.S.M., Goel, R., 2016. Methane dependent denitrification- from ecosystem to laboratory-scale enrichment for engineering applications. *Water Res.* 99, 244–252. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.04.070>
- Blackall, L.L., Crocetti, G.R., Saunders, A.M., Bond, P.L., 2002. A review and update of the microbiology of enhanced biological phosphorus removal in wastewater treatment plants. *Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* 81, 681–691. <https://doi.org/10.1023/A:1020538429009>
- Buntner, D., Sánchez, A., Garrido, J.M., 2013. Feasibility of combined UASB and MBR system in dairy wastewater treatment at ambient temperatures. *Chem. Eng. J.* 230, 475–481. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2013.06.043>
- Cai, C., Hu, S., Guo, J., Shi, Y., Xie, G.-J., Yuan, Z., 2015. Nitrate reduction by denitrifying anaerobic methane oxidizing microorganisms can reach a practically useful rate. *Water Res.* 87, 211–217. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.09.026>
- Cao, Q., Liu, X., Ran, Y., Li, Z., Li, D., 2019. Methane oxidation coupled to denitrification under microaerobic and hypoxic conditions in leach bed bioreactors. *Sci. Total Environ.* 649, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.289>
- Cao, Y., van Loosdrecht, M.C.M., Daigger, G.T., 2017. Mainstream partial nitrification-anammox in municipal wastewater treatment: status, bottlenecks, and further studies. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* <https://doi.org/10.1007/s00253-016-8058-7>
- Cavalcanti, P.F.F., Van Haandel, A., Lettinga, G., 2001. Polishing ponds for post-treatment of digested sewage part 1: Flow-through ponds, in: *Water Science and Technology*. IWA Publishing, pp. 237–245. <https://doi.org/10.2166/wst.2001.0229>

- Centeno-Mora, E., Fonseca, P.R., Andreão, W.L., Brandt, E.M.F., de Souza, C.L., de Lemos Chernicharo, C., 2020. Mitigation of diffuse CH₄ and H₂S emissions from the liquid phase of UASB-based sewage treatment plants: challenges, techniques, and perspectives. *Environ. Sci. Pollut. Res.* <https://doi.org/10.1007/s11356-020-08644-0>
- Centre European d'Etudes des Polyphosphates, 2001. Phosphate Recovery where do we stand today ? <http://www.ceep-phosphates.org/Files/Newsletter/ScopeNewsletter41.pdf>.
- Chernicharo, C.A.L., 2006. Post-treatment options for the anaerobic treatment of domestic wastewater. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* <https://doi.org/10.1007/s11157-005-5683-5>
- Chernicharo, C.A.L., Nascimento, M.C.P., 2001. Feasibility of a pilot-scale UASB/trickling filter system for domestic sewage treatment, in: *Water Science and Technology*. IWA Publishing, pp. 221–228. <https://doi.org/10.2166/wst.2001.0227>
- Chernicharo, C. A L., van Lier, J.B., Noyola, A., Bressani Ribeiro, T., 2015. Anaerobic sewage treatment: state of the art, constraints and challenges. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* <https://doi.org/10.1007/s11157-015-9377-3>
- Chernicharo, C. A.L., van Lier, J.B., Noyola, A., Bressani Ribeiro, T., 2015. Anaerobic sewage treatment: state of the art, constraints and challenges. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* <https://doi.org/10.1007/s11157-015-9377-3>
- Costa, C., Dijkema, C., Friedrich, M., García-Encina, P., Fernández-Polanco, F., Stams, A.J.M., 2000. Denitrification with methane as electron donor in oxygen-limited bioreactors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53, 754–762. <https://doi.org/10.1007/s002530000337>
- Crutchik, D., Garrido, J.M., 2011. Struvite crystallization versus amorphous magnesium and calcium phosphate precipitation during the treatment of a saline industrial wastewater. *Water Sci. Technol.* 64, 2460–2467. <https://doi.org/10.2166/wst.2011.836>
- De Sousa, J.T., Van Haandel, A.C., Guimarães, A.A.V., 2001. Post-treatment of anaerobic effluents in constructed wetland systems, in: *Water Science and Technology*. IWA Publishing, pp. 213–219. <https://doi.org/10.2166/wst.2001.0226>
- Díaz, C., Belmonte, M., Campos, J.L., Franchi, O., Faúndez, M., Vidal, G., Argiz,

- L., Pedrouso, A., Val del Rio, A., Mosquera-Corral, A., 2020. Limits of the anammox process in granular systems to remove nitrogen at low temperature and nitrogen concentration. *Process Saf. Environ. Prot.* 138, 349–355. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2020.03.025>
- dos Santos, S.L., Chaves, S.R.M., van Haandel, A., 2016. Influence of phase separator design on the performance of UASB reactors treating municipal wastewater. *Water SA* 42, 176–182. <https://doi.org/10.4314/wsa.v42i2.01>
- Engida, T.M., -Wu, * -Xu, -Wu, Z.B., 2020. REVIEW PAPER ON TREATMENT OF INDUSTRIAL AND DOMESTIC WASTEWATERS USING UASB REACTORS INTEGRATED INTO CONSTRUCTED WETLANDS FOR SUSTAINABLE REUSE. https://doi.org/10.15666/aeer/1802_31013129
- Ettwig, K.F., Butler, M.K., Le Paslier, D., Pelletier, E., Mangenot, S., Kuypers, M.M.M., Schreiber, F., Dutilh, B.E., Zedelius, J., de Beer, D., Gloerich, J., Wessels, H.J.C.T., van Alen, T., Luesken, F., Wu, M.L., van de Pas-Schoonen, K.T., Op den Camp, H.J.M., Janssen-Megens, E.M., Francoijs, K.-J., Stunnenberg, H., Weissenbach, J., Jetten, M.S.M., Strous, M., 2010. Nitrite-driven anaerobic methane oxidation by oxygenic bacteria. *Nature* 464, 543–8. <https://doi.org/10.1038/nature08883>
- Foresti, E., Zaiat, M., Vallero, M., 2006. Anaerobic processes as the core technology for sustainable domestic wastewater treatment: Consolidated applications, new trends, perspectives, and challenges. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 5, 3–19. <https://doi.org/10.1007/s11157-005-4630-9>
- Fux, C., Siegrist, H., 2004. Nitrogen removal from sludge digester liquids by nitrification/denitrification or partial nitrification/anammox: environmental and economical considerations. *Water Sci. Technol. a J. Int. Assoc. Water Pollut. Res.* 50, 19–26.
- Gonçalves, R.F., De Araújo, V.L., Bof, V.S., 1999. Combining upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors and submerged aerated biofilters for secondary domestic wastewater treatment, in: *Water Science and Technology*. No longer published by Elsevier, pp. 71–79. [https://doi.org/10.1016/S0273-1223\(99\)00611-3](https://doi.org/10.1016/S0273-1223(99)00611-3)
- Haroon, M.F., Hu, S., Shi, Y., Imelfort, M., Keller, J., Hugenholtz, P., Yuan, Z., Tyson, G.W., 2013. Anaerobic oxidation of methane coupled to nitrate reduction in a novel archaeal lineage. *Nature* 500, 567–570. <https://doi.org/10.1038/nature12375>
- He, Z., Cai, C., Wang, J., Xu, X., Zheng, P., Jetten, M.S.M., Hu, B., 2016. A novel

- denitrifying methanotroph of the NC10 phylum and its microcolony. *Nat. Publ. Gr.* <https://doi.org/10.1038/srep32241>
- Hu, B., He, Z., Geng, S., Cai, C., Lou, L., Zheng, P., Xu, X., 2014. Cultivation of nitrite-dependent anaerobic methane-oxidizing bacteria: Impact of reactor configuration. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 7983–7991. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5835-z>
- Jing, C., Ping, Z., Mahmood, Q., 2010. Influence of various nitrogenous electron acceptors on the anaerobic sulfide oxidation. *Bioresour. Technol.* 101, 2931–2937. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.047>
- Kampman, C., Hendrickx, T.L.G., Luesken, F.A., van Alen, T.A., Op den Camp, H.J.M., Jetten, M.S.M., Zeeman, G., Buisman, C.J.N., Temmink, H., 2012. Enrichment of denitrifying methanotrophic bacteria for application after direct low-temperature anaerobic sewage treatment. *J. Hazard. Mater.* 227–228, 164–171. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.05.032>
- Kampman, C., Temmink, H., Hendrickx, T.L.G., Zeeman, G., Buisman, C.J.N., 2014. Enrichment of denitrifying methanotrophic bacteria from municipal wastewater sludge in a membrane bioreactor at 20 °C. *J. Hazard. Mater.* 274, 428–435. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2014.04.031>
- Khan, A.A., Zahid Gaur, R., Tyagi, V.K., Khursheed, A., Lew, B., Mehrotra, I., Kazmi, A.A., 2011. Sustainable options of post treatment of UASB effluent treating sewage: A review 55, 1232–1251. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2011.05.017>
- Khanal, S.K., 2008. Anaerobic Biotechnology for Bioenergy Production Principles and Applications, in: *Anaerobic Biotechnology for Bioenergy Production*. A John Wiley & Sons, United States, pp. i–xv. <https://doi.org/10.1002/9780813804545.fmatter>
- Kim, J.H., Guo, X., Park, H.S., 2008. Comparison study of the effects of temperature and free ammonia concentration on nitrification and nitrite accumulation. *Process Biochem.* 43, 154–160. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2007.11.005>
- Kor-Bicakci, G., Eskicioglu, C., 2019. Recent developments on thermal municipal sludge pretreatment technologies for enhanced anaerobic digestion. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 110, 423–443 Contents. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.05.002>

- Kurth, J.M., Smit, N.T., Berger, S., Schouten, S., Jetten, M.S.M., Welte, C.U., 2019. Anaerobic methanotrophic archaea of the ANME-2d clade feature lipid composition that differs from other ANME archaea. *FEMS Microbiol. Ecol.* 95. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiz082>
- Lettinga, G., Rebac, S., Zeeman, G., 2001. Challenge of psychrophilic anaerobic wastewater treatment. *Trends Biotechnol.* 19, 363–370. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(01\)01701-2](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(01)01701-2)
- Lettinga, G., van Velsen, A.F.M., Hobma, S.W., de Zeeuw, W., Klapwijk, A., 1980. Use of the upflow sludge blanket (USB) reactor concept for biological wastewater treatment, especially for anaerobic treatment. *Biotechnol. Bioeng.* 22, 699–734. <https://doi.org/10.1002/bit.260220402>
- Lim, Z.K., Liu, T., Zheng, M., Yuan, Z., Guo, J., Hu, S., 2021. Versatility of nitrite/nitrate-dependent anaerobic methane oxidation (n-DAMO): first demonstration with real wastewater. *Water Res.* 194, 116912. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.116912>
- Liu, J., Sun, F., Wang, L., Ju, X., Wu, W., Chen, Y., 2014. Molecular characterization of a microbial consortium involved in methane oxidation coupled to denitrification under micro-aerobic conditions. *Microb. Biotechnol.* 7, 64–76. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12097>
- Liu, Y., Kumar, S., Kwag, J.H., Ra, C., 2013. Magnesium ammonium phosphate formation, recovery and its application as valuable resources: A review. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* <https://doi.org/10.1002/jctb.3936>
- Luesken, F.A., Sánchez, J., van Alen, T.A., Sanabria, J., Op denCamp, H.J.M., Jetten, M.S.M., Kartal, B., 2011. Simultaneous nitrite-dependent anaerobic methane and ammonium oxidation processes. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 6802–6807. <https://doi.org/10.1128/AEM.05539-11>
- Mahmood, Q., Zheng, P., Cai, J., Wu, D., Hu, B., Islam, E., Azim, M.R., 2007. Comparison of anoxic sulfide biooxidation using nitrate/ nitrite as electron acceptor. *Environ. Prog.* 26, 169–177. <https://doi.org/10.1002/ep.10201>
- Mahmood, Q., Zheng, P., Hayat, Y., Islam, E., Wu, D., Ren-cun, J., 2008. Effect of pH on anoxic sulfide oxidizing reactor performance. *Bioresour. Technol.* 99, 3291–3296. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.07.006>
- Mai, D T, Kunacheva, C., Stuckey, D.C., 2018. Critical Reviews in Environmental Science and Technology A review of posttreatment technologies for anaerobic

- effluents for discharge and recycling of wastewater A review of posttreatment technologies for anaerobic effluents for discharge and recycling of. *Environ. Sci. Technol.* 48, 167–209. <https://doi.org/10.1080/10643389.2018.1443667>
- Mai, D. T., Kunacheva, C., Stuckey, D.C., 2018. A review of posttreatment technologies for anaerobic effluents for discharge and recycling of wastewater. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 48, 167–209. <https://doi.org/10.1080/10643389.2018.1443667>
- Mainardis, M., Buttazzoni, M., Goi, D., 2020. Up-flow anaerobic sludge blanket (Uasb) technology for energy recovery: A review on state-of-the-art and recent technological advances. *Bioengineering*. <https://doi.org/10.3390/bioengineering7020043>
- Manconi, I., Carucci, A., Lens, P., 2007. Combined removal of sulfur compounds and nitrate by autotrophic denitrification in bioaugmented activated sludge system. *Biotechnol. Bioeng.* 98, 551–560. <https://doi.org/10.1002/bit.21383>
- Mchugh, S., Reilly, C.O., Colleran, E., Flaherty, V.O., Mahony, T., 2004. Anaerobic granular sludge bioreactor technology. *Rev. Environ. Sci. Bio/Technology* 2, 225–245.
- Mechsner, K., Hamer, G., 1985. Denitrification by Methanotrophic / Methylotrophic Bacterial Associations in Aquatic Environments, in: *Denitrification in the Nitrogen Cycle*. Springer US, pp. 257–271. https://doi.org/10.1007/978-1-4757-9972-9_16
- Merlin Christy, P., Gopinath, L.R., Divya, D., 2014. A review on anaerobic decomposition and enhancement of biogas production through enzymes and microorganisms. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 34, 167–173. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.03.010>
- Metcalf&Eddy, Tchobanoglous, G., Stensel, D., Tsuchihashi, R., Burton, F., 2014. *Wastewater Engineering*, Fifth edit. ed. McGraw Hill, New York.
- Moawad, A., Mahmoud, U.F., El-Khateeb, M.A., El-Molla, E., 2009. Coupling of sequencing batch reactor and UASB reactor for domestic wastewater treatment. *Desalination* 242, 325–335. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2008.05.011>
- Moraes, B.S., Souza, T.S.O., Foresti, E., 2012. Effect of sulfide concentration on autotrophic denitrification from nitrate and nitrite in vertical fixed-bed reactors. *Process Biochem.* 47, 1395–1401.

<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.05.008>

- Nie, W.-B., Xie, G.-J., Ding, J., Lu, Y., Liu, B.-F., Xing, D.-F., Wang, Q., Han, H.-J., Yuan, Z., Ren, N.-Q., 2019. High performance nitrogen removal through integrating denitrifying anaerobic methane oxidation and Anammox: from enrichment to application. *Environ. Int.* 132, 105107. <https://doi.org/10.1016/J.ENVINT.2019.105107>
- Pedrouso, A., Aiartza, I., Morales, N., Vázquez-Padín, J.R., Rogalla, F., Campos, J.L., Mosquera-Corral, A., Val del Río, A., 2018. Pilot-scale ELAN® process applied to treat primary settled urban wastewater at low temperature via partial nitrification-anammox processes. *Sep. Purif. Technol.* 200, 94–101. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2018.02.017>
- Pelaz, L., Gómez, A., Garralón, G., Letona, A., Fdz-Polanco, M., 2017. Denitrification of the anaerobic membrane bioreactor (AnMBR) effluent with alternative electron donors in domestic wastewater treatment. *Bioresour. Technol.* <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.168>
- Prakash, K.J., Tyagi, V.K., Kazmi, A.A., Kumar, A., 2007. Post-treatment of UASB reactor effluent by coagulation and flocculation process. *Environ. Prog.* 26, 164–168. <https://doi.org/10.1002/ep.10192>
- Raghoebarsing, A.A., Pol, A., Van De Pas-Schoonen, K.T., Smolders, A.J.P., Ettwig, K.F., Rijpstra, W.I.C., Schouten, S., Sinninghe Damsté, J.S., Op Den Camp, H.J.M., Jetten, M.S.M., Strous, M., 2006. A microbial consortium couples anaerobic methane oxidation to denitrification. *Nature* 440, 918–921. <https://doi.org/10.1038/nature04617>
- Reyes-Avila, J., Razo-Flores, E., Gomez, J., 2004. Simultaneous biological removal of nitrogen, carbon and sulfur by denitrification. *Water Res.* 38, 3313–3321. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2004.04.035>
- Robles, Á., Durán, F., Giménez, J.B., Jiménez, E., Ribes, J., Serralta, J., Seco, A., Ferrer, J., Rogalla, F., 2020. Anaerobic membrane bioreactors (AnMBR) treating urban wastewater in mild climates. *Bioresour. Technol.* 314, 123763. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123763>
- Ruscalleda Beylier, M., Balaguer, M.D., Colprim, J., Pellicer-Nàcher, C., Ni, B.J., Smets, B.F., Sun, S.P., Wang, R.C., 2011. Biological Nitrogen Removal from Domestic Wastewater, in: *Comprehensive Biotechnology, Second Edition*. Elsevier Inc., pp. 329–340. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00533-X>

- Sánchez, A., Rodríguez-Hernández, L., Buntner, D., Esteban-García, A.L., Tejero, I., Garrido, J.M., 2016. Denitrification coupled with methane oxidation in a membrane bioreactor after methanogenic pre-treatment of wastewater. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 91, 2950–2958. <https://doi.org/10.1002/jctb.4913>
- Sax, N.I., Lewis, R.J., 1989. *Dangerous properties of industrial materials*, 7th ed. Van Nostrand Reinhold, New York, NY.
- Sevillano, C.A., Pesantes, A.A., Peña Carpio, E., Martínez, E.J., Gómez, X., 2021. Anaerobic digestion for producing renewable energy-the evolution of this technology in a new uncertain scenario. *Entropy*. <https://doi.org/10.3390/e23020145>
- Silva-Teira, A., Sánchez, A., Buntner, D., Rodríguez-Hernández, L., Garrido, J.M., 2017. Removal of dissolved methane and nitrogen from anaerobically treated effluents at low temperature by MBR post-treatment. *Chem. Eng. J.* <https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.06.047>
- Srinivasa Raghavan, D.S., Qiu, G., Song, Y., Ting, Y.P., 2017. Anaerobic Treatment of Low-Strength Wastewater, in: *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Biological Treatment of Industrial Effluents*. Elsevier Inc., pp. 293–320. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63665-2.00012-6>
- Strous, M., Kuenen, J.G., Jetten, M.S.M., 1999. Key physiology of anaerobic ammonium oxidation. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 3248–3250. <https://doi.org/10.1128/aem.65.7.3248-3250.1999>
- Thalasso, F., Vallecillo, A., García-Encina, P., Fdz-Polanco, F., 1997. The use of methane as a sole carbon source for wastewater denitrification. *Water Res.* 31, 55–60. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(96\)00228-X](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(96)00228-X)
- van der Star, W.R.L., Abma, W.R., Blommers, D., Mulder, J.W., Tokutomi, T., Strous, M., Picioreanu, C., van Loosdrecht, M.C.M., 2007. Startup of reactors for anoxic ammonium oxidation: Experiences from the first full-scale anammox reactor in Rotterdam. *Water Res.* 41, 4149–4163. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.03.044>
- Van Lier, J.B., Vashi, A., Van Der Lubbe, J., Heffernan, B., 2010. Anaerobic sewage treatment using UASB reactors: Engineering and operational aspects, in: *Environmental Anaerobic Technology: Applications and New Developments*. Imperial College Press, pp. 59–89. https://doi.org/10.1142/9781848165434_0004

- Versantvoort, W., Guerrero-Cruz, S., Speth, D.R., Frank, J., Gambelli, L., Cremers, G., van Alen, T., Jetten, M.S.M., Kartal, B., Op den Camp, H.J.M., Reimann, J., 2018. Comparative genomics of *Candidatus Methyloirabilis* species and description of *Ca. Methyloirabilis lanthanidiphila*. *Front. Microbiol.* 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01672>
- Von Sperling, M., De lemos Chernicharo, C.A., 2005. *Biological Wastewater Treatment in warm Climate Regions*. IWA Publishing, London.
- Von Sperling, M., Freire, V.H., De Lemos Chernicharo, C.A., 2001. Performance evaluation of a UASB-activated sludge system treating municipal wastewater, in: *Water Science and Technology*. IWA Publishing, pp. 323–328. <https://doi.org/10.2166/wst.2001.0698>
- von Sperling, M., Mascarenhas, L.C.A.M., 2005. Performance of very shallow ponds treating effluents from UASB reactors. *Water Sci. Technol.* 51, 83–90. <https://doi.org/10.2166/wst.2005.0432>
- Wang, B., Gong, X., Peng, Y., 2021. Simultaneous anammox-denitrification process and its emerging extensions. *Chem. Eng. J.* 415. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.128380>
- Wang, Z., 2021. Effect of low temperature on the performance of UASB reactor for municipal wastewater treatment: recent advances and future perspectives. *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.* 621, 12103. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/621/1/012103>
- Xiao, K., Liang, S., Wang, X., Chen, C., Huang, X., 2019. Current state and challenges of full-scale membrane bioreactor applications: A critical review. *Bioresour. Technol.* <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.09.061>
- Xie, G.J., Cai, C., Hu, S., Yuan, Z., 2017. Complete nitrogen removal from synthetic anaerobic sludge digestion liquor through integrating anammox and denitrifying anaerobic methane oxidation in a membrane biofilm reactor. *Environ. Sci. Technol.* 51, 819–827. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b04500>
- Xu, X., Zhu, J., Thies, J.E., Wu, W., 2020. Methanol-linked synergy between aerobic methanotrophs and denitrifiers enhanced nitrate removal efficiency in a membrane biofilm reactor under a low O₂:CH₄ ratio. *Water Res.* 174, 115595. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.115595>



CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

Resumen

Este capítulo incorpora una recopilación de la metodología analítica que se ha utilizado en los cuatro capítulos experimentales que componen esta tesis, dejando de lado aquellos métodos utilizados de forma específica en alguno de los capítulos, que se detallan en los mismos. Para conocer la evolución de los sistemas estudiados, se realizaron analíticas de muestras de agua, lodo y gases, analizando en la fase líquida parámetros como DQO, metano disuelto, ácidos grasos volátiles (AGV) compuestos de nitrógeno (amonio, nitrito y nitrato) e ion ortofosfato así como medidas de pH, oxígeno disuelto, potencial redox, temperatura, conductividad e iones en general, tanto aniones (Cl^- , PO_4^{3-} , SO_4^{2-}) como cationes (Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+}), así como de diversos microcontaminantes orgánicos (OMP). La concentración de sólidos en suspensión de las muestras líquidas y lodos se ha realizado midiendo SSTLM y SSVLM. Se ha analizado el contenido de CO_2 y CH_4 de muestras de gases. Para muchos de los parámetros analizados, se siguieron los procedimientos establecidos en el *Standard Methods* (APHA, 2005). La caracterización microbiológica de lodo, correspondientes a muestras tanto de biomasa en suspensión como biopelícula, se ha realizado mediante FISH y el análisis metagenómico mediante Illumina.

Este capítulo no constituye una parte original de esta tesis y se ha incluido para facilitar información de los métodos analíticos utilizados a otros investigadores, brindándoles la oportunidad de poder contrastar e interpretar, de forma más precisa, los resultados experimentales de esta tesis.

ÍNDICE DE CONTENIDOS - CAPÍTULO 2

2.1 FASE LÍQUIDA	33
2.1.1 Demanda Química de Oxígeno (DQO)	33
2.1.2 Carbono Orgánico Disuelto Total (DOC).....	35
2.1.3 Ácidos Grasos Volátiles (AGVs)	36
2.1.4 Metano disuelto	36
2.1.5 Aniones y cationes.....	37
2.1.6 Compuestos de nitrógeno.....	38
2.1.7 pH	41
2.1.8 Potencial de oxidación-reducción (ORP)	41
2.1.9 Oxígeno disuelto (OD) y temperatura	41
2.1.10 Compuestos de fósforo	41
2.1.11 Microcontaminantes	43
2.2 FASE SÓLIDA	45
2.2.1 Sólidos en suspensión totales y volátiles del licor de mezcla (SSTLM y SSVLM)	45
2.3 FASE GAS	46
2.3.1 Caudal del gas generado	46
2.3.2 Composición del gas.....	47
2.4 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS	47
2.4.1 Identificación de poblaciones por FISH	47
2.4.2 Determinación de diversidad microbiana mediante secuenciación de genes	52
2.5 BIBLIOGRAFÍA	52

2.1 FASE LÍQUIDA

En este apartado se especifica la metodología empleada para la determinación de los parámetros en muestras de agua residual. Para aquellos parámetros que implicaron el análisis de un parámetro disuelto en fase líquida, se pretrataron las muestras previamente usando filtros de membrana de nitrocelulosa, con un tamaño de poro de 0,45 μm (HA Millipore), eliminando los compuestos en suspensión.

2.1.1 Demanda Química de Oxígeno (DQO)

La Demanda Química de Oxígeno es una medida indicativa de la cantidad de oxígeno que se precisa para oxidar compuestos contaminantes, presentes en fase líquida y se suele dar en concentraciones de miligramo por litro. Éste es el principal parámetro para determinar la concentración de materia orgánica presente en el agua residual. Se empleó el método de Soto et al. (1989) para la determinación de la DQO_T y DQOs. El oxidante empleado es el ion dicromato, empleando dicromato potásico ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$). El método consiste en el uso de un catalizador, sulfato de plata, para fomentar la oxidación de los compuestos orgánicos en condiciones ácidas, reduciéndose el $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$. La fracción no reducida de dicromato se valora con sulfato de amonio ferroso (FAS) para calcular la cantidad de oxidante consumida, determinando el dato de materia orgánica oxidable en términos de oxígeno equivalente. Se debe señalar que con este método no se oxida el amonio presente en la muestra, por lo que con las concentraciones presentes en las muestras no se producirían anomalías en la medida, pero si se producen por la presencia de sulfuro o nitrito que pudiesen estar presentes en las muestras. La presencia de ion cloruro podría interferir también en la medida, por ello y para evitar dicha interferencia se usa en la determinación analítica sulfato de mercurio, que actúa como agente enmascarante.

Reactivos empleados

- Disolución concentrada de digestión estándar de dicromato potásico: se disuelven 10,216 g de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ y 33 g de HgSO_4 en 500 mL de agua destilada. Después se añaden 167 mL de H_2SO_4 concentrado, la disolución se enfría a temperatura ambiente y se diluye en 1000 mL.

- Disolución diluida de digestión estándar de dicromato potásico: se disuelven 2,44 g de $K_2Cr_2O_7$ y 17 g de $HgSO_4$ en 500 mL de agua destilada. Después se añaden 167 mL de H_2SO_4 concentrado, la disolución se enfría a temperatura ambiente y se diluye en 1000 mL.
- Reactivo de ácido sulfúrico: se añaden 10,7 g de Ag_2SO_4 en 1000 mL de H_2SO_4 concentrado. Deben pasar 2 días desde su preparación para poder usarse.
- Disolución del indicador de ferroína: se disuelven 1,485 g de $C_{18}H_{18}N_2 \cdot H_2O$ (monohidrato de fenantrolina) y 0,695 g de $SO_4Fe \cdot 7H_2O$ en 100 mL de agua destilada.
- Disolución estándar de dicromato de potasio (0,05 N): se disuelven 1,226 g de $K_2Cr_2O_7$, secados previamente a 105 °C durante 2 horas, en 500 mL de agua destilada.
- Disolución concentrada de Sulfato Amónico Ferroso (FAS) (0,035 N): se disuelven 13,72 g de $(NH_4)_2Fe(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$ en agua destilada. Posteriormente se añaden 20 mL de H_2SO_4 concentrado, se enfría la disolución y se lleva a un volumen de 1000 mL. Esta disolución se emplea para muestras con una concentración de DQO entre 90 y 900 mg L^{-1} .
- Disolución diluida de FAS (0,016 N): se disuelven 6,28 g de $(NH_4)_2Fe(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$ en agua destilada. Posteriormente se añaden 20 mL de H_2SO_4 concentrado, se enfría la disolución y se lleva a un volumen de 1000 mL. Esta disolución se emplea para muestras con una concentración de DQO de hasta 90 mg L^{-1} .

Procedimiento de determinación

Se toman 2,5 mL de muestra del agua residual en un tubo Pyrex de 10 mL. Luego se añaden 1,5 mL de la disolución de digestión concentrada o diluida, según el contenido de DQO de la muestra. Posteriormente se añaden lentamente y con el tubo inclinado 3,5 mL del reactivo de ácido sulfúrico para que se deposite en el fondo sin mezclarse. Los tubos se sellan con teflón y se colocan las tapas, se agitan de manera que se mezclen bien los reactivos, y finalmente se introducen en una placa digestora

(HACH 16500-100) a 150 °C durante 2 horas. Tras finalizar la digestión, los tubos se enfrían a temperatura ambiente. Después de enfriarse, el contenido de los tubos se transfiere a un vaso de 50 mL, se añaden 2 gotas de ferroína, un indicador redox, y se valora con FAS concentrado o diluido en función de la DQO presente. Se usan 2,5 mL de agua destilada para preparar una muestra de referencia, un blanco, que actúa como referencia representando la DQO de agua destilada. El valor de la DQO se determina usando la Ecuación 2.1.

$$DQO = \frac{(A-B) \cdot 8000 \cdot N_{FAS}}{V} \quad \text{Ecuación 2.1}$$

Donde DQO es la demanda química de oxígeno ($\text{mg O}_2 \text{ L}^{-1}$); A es el volumen (mL) de FAS consumido por el blanco; B es el volumen (mL) de FAS consumido por la muestra objeto de análisis, 8000 es un factor que tiene en cuenta la masa de un miliequivalente de oxígeno ($8 \text{ mg meq}^{-1} \text{ O}_2$) y el cambio de unidades de volumen de mL a L (1000 mL L^{-1}) N_{FAS} es la normalidad del FAS empleado; y V es el volumen (mL) de la muestra (teniendo en cuenta si se ha realizado alguna dilución).

La normalidad del FAS se comprueba diariamente añadiendo 5 mL de agua destilada en el vaso de 50 mL y 3,5 mL del reactivo de ácido sulfúrico. Con la muestra fría se añaden 5 mL de la disolución estándar de dicromato de potasio (0,05 N) y se valora con FAS, usando ferroína como indicador. La normalidad se calcula mediante la Ecuación 2.2.

$$N_{FAS} = \frac{5 \cdot 0,05}{V_{FAS}} \quad \text{Ecuación 2.2}$$

Donde N_{FAS} es la normalidad del FAS, y V_{FAS} es el volumen de FAS consumido.

2.1.2 Carbono Orgánico Disuelto Total (DOC)

La medida de la concentración de carbono orgánico total (TOC) no depende del estado de oxidación de la materia orgánica ni mide compuestos como nitrógeno u otros elementos inorgánicos que pueden contribuir a la demanda de oxígeno medida por DQO (APHA, 2005). El parámetro analizado es el CTD (Carbono Total Disuelto) debido a que el equipo empleado solo puede analizar muestras filtradas. Se empleó un analizador Shimadzu (TOC-5000) calculando el COD como la diferencia entre el CTD y el CID (Carbono Inorgánico Disuelto), conectado a un muestreador automático (Shimadzu ASI-5000-S). Las concentraciones de CTD se calculan por la cantidad de

CO₂ producida durante la combustión de la muestra a 680 °C usando como catalizador platino inmovilizado sobre esferas de alúmina. Los valores de CID se obtienen por el CO₂ producido por la descomposición de la muestra a temperatura ambiente con un reactivo ácido, H₃PO₄ al 25%, que se mide con un analizador de infrarrojos no dispersivos (NDIR) después de ser enfriado y secado. El límite de detección del equipo es de 2 mg L⁻¹.

2.1.3 Ácidos Grasos Volátiles (AGVs)

Los AGVs se analizaron por un equipo de cromatografía de gases (HP, 5890A) equipado con un detector de llama ionizante y un inyector automático (HP, 7673A). Se llevó a cabo en una columna de vidrio (3 m de longitud y 2 mm de diámetro interno). La columna, inyector y detector trabajan a temperaturas de 105, 260 y 280 °C, respectivamente. Se usa nitrógeno gas saturado con ácido fórmico como gas portador con un caudal de 24 mL min⁻¹. Se usa aire e H₂ como gases auxiliares con caudales respectivamente de 400 y 30 mL min⁻¹. Los AGVs se queman y miden en el detector de ionización de llama, con un rango de medida de 0-1 g L⁻¹.

2.1.4 Metano disuelto

La medida de metano disuelto en fase líquida se determinó adaptando el protocolo de Souza et al. (2011). Se toman 300 mL de la fase líquida y se depositan lenta y cuidadosamente en una botella de vidrio Pyrex de 500 mL, cerrada con un tapón con septum. A continuación, la botella se agita enérgicamente durante un mínimo de 3 minutos para alcanzar el equilibrio entre la fase gas y el líquido. Después se toma 1 mL de gas del espacio de cabeza, que se analiza por cromatografía de gases, método detallado en la sección 2.3.1. La concentración de metano se estima con la Ley de Henry (Ecuación 2.3).

$$k_H = \frac{C_a}{p_g} \quad \text{Ecuación 2.3}$$

Donde k_H es la constante de la Ley de Henry, (mol L⁻¹ atm⁻¹); C_a es la concentración de metano en la fase líquida (mol L⁻¹); p_g es la presión parcial del gas (atm).

La constante de la Ley de Henry depende de la temperatura. La ecuación 2.4 muestra esa dependencia.

$$k_H = k_H^\theta \cdot \exp\left(\frac{-\Delta H_{sol}}{R} \cdot \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T^\theta}\right)\right) \quad \text{Ecuación 2.4}$$

Donde k_H^θ es la constante de la Ley de Henry en condiciones estándar (298.15°K); ΔH_{sol} es la entalpía de la muestra; R es la constante del gas (8.314 J mol⁻¹ K⁻¹); T es la temperatura de la muestra; T^θ es la temperatura en condiciones estándar. Los valores k_H^θ and $\Delta_{sol}H/R$ se tomaron de Sander (2015).

Con la composición de metano en fase gas y fase líquida, se calcula la concentración total de la muestra.

Las muestras ambientales tomadas en el prototipo SIAM ubicado en una industria láctea, localizada en la provincia de Lugo (capítulo 5 de esta tesis), no fueron analizadas en el momento de la toma de muestra. Por tanto, se procedió a añadir sal en la botella de la muestra, adaptando el procedimiento de Daelman et al. (2012).

El procedimiento es similar al anterior. Previamente a la toma de muestras, se añadieron 60 g de NaCl a la botella que actuaría como inhibidor de la biotransformación de metano, una vez tomada la muestra. Posteriormente, se toman 300 mL de la fase líquida y se depositan lenta y cuidadosamente en una botella de vidrio Pyrex de 500 mL. Se agita vigorosamente hasta que el NaCl se disuelva por completo, inhibiendo la actividad biológica para que no se consuma el metano disuelto. En el momento de determinar la concentración de metano disuelto, se agita vigorosamente la botella con el fin de alcanzar el equilibrio entre la fase gas y el líquido. El exceso de volumen de gas generado a causa del NaCl se cuantifica para los cálculos posteriores, insertando una jeringa en el septum que recoge el gas en exceso para obtener una presión en la fase gas de 1 atm. Tras este paso, se analiza el metano en la fase gas por cromatografía de gases. En los cálculos realizados, se debe obtener la masa de la muestra tomada sin incluir la masa del NaCl añadido. El volumen de gas extraído en la jeringa debe ser añadido al volumen de fase gas de la botella para contabilizar el volumen total de fase gas a presión atmosférica.

2.1.5 Aniones y cationes

Los aniones (Cl⁻, PO₄³⁻, SO₄²⁻, NO₂⁻ y NO₃⁻) y cationes (Na⁺, K⁺, Mg²⁺, Ca²⁺ y NH₄⁺) presentes en la fase líquida se analizan empleando un cromatógrafo de iones 861 Advanced Compact IC y un procesador de muestras 838 Advanced Sample Processor. Para detectar aniones se empleó una columna Metrosep A Supp 5-250, y para cationes una columna Metrosep C3-250.

Tabla 2.1. Rango de medida de concentración de aniones y cationes por cromatografía de iones.

Rango	Cl ⁻	PO ₄ ³⁻	SO ₄ ²⁻	NO ₂ ⁻	NO ₃ ⁻	Na ⁺	K ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺	NH ₄ ⁺
Máximo (mg L ⁻¹)	100	50	150	5	50	150	50	50	50	10
Mínimo (mg L ⁻¹)	1	0.5	1.5	0.05	0.5	1.5	0.5	0.5	0.5	0.1

2.1.6 Compuestos de nitrógeno

Los iones de nitrógeno amonio, nitrito y nitrato, se analizaron mediante métodos espectrofotométricos y ocasionalmente por el método de cromatografía de iones señalado en la sección 2.1.5.

2.1.6.1 Amonio

El nitrógeno total presente como amonio (NH₄⁺-N) se determinó por espectrofotometría empleando el método de Bower y Holm-Hansen (1980) por el que se hace reaccionar amonio con salicilato e hipoclorito, en presencia de nitroprusiato de sodio, para formar indofenol, que genera un color azul, cuya intensidad es función de la concentración de amonio. El método sirve para medir concentraciones comprendidas entre 0 y 1 mg N L⁻¹ como amonio.

Reactivos

- Reactivo A: disolución de 0,28 g L⁻¹ de nitroprusiato de sodio y 440 g L⁻¹ de salicilato de sodio.
- Reactivo B: disolución de 18,5 g L⁻¹ de NaOH y 120 g L⁻¹ de citrato de sodio.
- Reactivo C: disolución comercial estándar de hipoclorito sódico (5%).
- Reactivo D: disolución preparada mezclando 7 partes de reactivo B y 1 parte de reactivo C. El reactivo D es estable durante 1 hora tras su preparación.

Procedimiento

Se toman 5 mL de la muestra a analizar filtrada (incluida dilución si fuese necesaria). Se añaden 600 μL del reactivo A y se mezclan. Luego se añade 1 mL del reactivo D y se vuelve a mezclar. Tras estos pasos, se deja la muestra en reposo y en oscuridad entre 2 y 3 horas. Al finalizar este tiempo, se mide la absorbancia con un espectrofotómetro (UV-1800, Shimadzu) a una longitud de onda de 640 nm. La concentración de amonio se obtiene mediante una recta de calibrado de la que se obtiene una ecuación lineal. Dicha recta de calibrado se construye empleando una disolución estándar certificada de NH_4Cl .

2.1.6.2 Nitrito

El nitrógeno presente como nitrito (NO_2^- -N) se determinó por el método colorimétrico 4500- NO_2^- -B, descrito en *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2005). La concentración de nitrito se obtiene por la aparición de un color rojizo-morado producido a pH 2-2,5. El rango de medida de este método está entre 0 y 0,3 mg NO_2^- -N L^{-1} en muestras filtradas.

Reactivos

- Reactivo A: Sulfanilamida ($\text{C}_6\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$): se disuelven 10 g de sulfanilamida en 100 mL de HCl concentrado y 600 mL de agua destilada. Se deja enfriar y se lleva a un volumen de 1000 mL con agua destilada.
- Reactivo B: NED ($\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{Cl}_2\text{N}_2$): se disuelven 0,5 g de NED en 500 mL de agua destilada.

Procedimiento

Con una muestra de 5 mL filtrada (incluida dilución de haberla), primero se añaden 100 μL del reactivo A y se agita. Segundo, se añaden otros 100 μL del reactivo B y se agita fuertemente. Se guarda en oscuridad durante 20 minutos y se mide por espectrofotometría (UV-1800 Shimadzu) a una longitud de onda de 543 nm. La concentración de nitrito se calcula mediante una curva de calibrado que se obtiene usando una disolución patrón de NaNO_2 .

2.1.6.3 Nitrato

El nitrógeno presente como nitrato (NO_3^- -N) se determinó por el colorimétrico 4500- NO_3^- -B, descrito en *Standard Methods for the examination of Water and Wastewater* (APHA, 2005). La concentración de nitrato no presenta coloración alguna y se debe medir por este método en muestras con bajo contenido en materia orgánica. El rango de medida de este método está entre 0 y 3 mg NO_3^- -N L^{-1} en muestras filtradas.

Reactivos

- Reactivo A: HCl 1N. Se emplea para acidificar y evitar posibles interferencias por hidróxidos o carbonatos.
- Reactivo B: se usa una pequeña cantidad de ácido sulfónico (H_3NSO_3) para evitar interferencias con nitrito.

Procedimiento

Con una muestra de 5 ml filtrada (incluida dilución de haberla), primero se añaden 100 μL del reactivo A y se agita. Segundo, la punta de una espátula (sobre 1 mg) del reactivo B y se agita fuertemente. Sin necesidad de esperar, se mide la absorbancia a 2 longitudes de onda diferentes, 220 y 275 nm, en un espectrofotómetro UV-1800, Shimadzu, en cubetas de cuarzo. Debido a que la materia orgánica absorbe radiación también a 220 nm, y el nitrato no lo hace a 275 nm, se realiza una segunda medida a 275 nm para corregir el valor de concentración de nitrato. Tanto para la muestra como para el calibrado se debe restar 2 veces la absorbancia leída a 275 nm (materia orgánica) de la leída a 220 nm tal como muestra la Ecuación 2.5. Si el valor corregido supera en un 10% el valor leído a 220 nm, este método debe ser sustituido por otro. La concentración de nitrito se calcula mediante una curva de calibrado que se obtiene usando una disolución estándar certificada de KNO_3 (20 mg N L^{-1}).

$$\text{Nitrato} = a \cdot (A_{220\text{nm}} - 2 \cdot A_{275\text{nm}}) + b \quad \text{Ecuación 2.5}$$

Donde a y b son respectivamente la pendiente y la ordenada en el origen obtenidas en la recta de calibración; $A_{220\text{nm}}$ y $A_{275\text{nm}}$ son las absorbancias medidas a esas longitudes de onda.

2.1.7 pH

Las medidas de pH se realizaron con un medidor pH/mV CRISON GLP 22, al que se conectó un electrodo de pH CRISON Instruments 52-03, con una sensibilidad de ± 1 mV, que se corresponde con 0,01 unidades de pH. El electrodo se calibra diariamente con disoluciones estándar de pH (7 y 4) a temperatura ambiente.

2.1.8 Potencial de oxidación-reducción (ORP)

Para medir el ORP se empleó un medidor portátil PC70 (XS Instruments) al que se conectó un electrodo polyplast ORP BNC, Hamilton. El rango de medida se situó entre -2000 y +2000 mV.

2.1.9 Oxígeno disuelto (OD) y temperatura

Estos dos parámetros se monitorizaron empleando un equipo multiparamétrico portátil Hach HQ40d, con una sonda óptica luminiscente IntelliCAL LDO101, que mide simultáneamente OD y temperatura.

2.1.10 Compuestos de fósforo

2.1.10.1 Fósforo total

Para analizar el fósforo soluble total, se digiere la muestra con el fin de hidrolizar los polifosfatos a ortofosfato, que se analizará por el método descrito en la siguiente sección (2.1.10.2). Para realizar la digestión de la muestra, se sigue el siguiente procedimiento (con reactivos del método indicado):

- Se toma una muestra de 50 mL y se añade 1 gota de fenolftaleína. Si se pone de color rojo, se añade gota a gota el reactivo A (H_2SO_4 5 N) hasta que el color rojo desaparece.
- Se añaden 1 mL de disolución H_2SO_4 (300 mL de ácido concentrado en 1 L de agua destilada) y 0,4 g de $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$.

- Se hierve durante 30-40 minutos hasta que queda un volumen de 10 mL y se digiere durante 1,5-2 horas.
- La mezcla se enfría y se lleva a un volumen de 30 mL con agua destilada.
- Se añade una gota de fenolftaleína y se neutraliza con NaOH 1N hasta que aparece un color rosado.
- A partir de aquí se aplica el método descrito en la siguiente sección para determinar ortofosfatos.

2.1.10.2 Ortofosfatos

La concentración de ortofosfatos se determina con el método 4500-P-E descrito en *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2005).

Reactivos

- Reactivo A: ácido sulfúrico 5 N.
- Reactivo B: disolución de tartrato de antimonio y potasio. Se añaden 1,3715 g de $K(SbO)C_4H_4O_6 \cdot 0,5H_2O$ en 500 mL de agua destilada. Esta disolución se debe guardar en una botella con tapón de vidrio para preservarse.
- Reactivo C: disolución de molibdato de amonio. Se disuelven 20 g de $(NH_4)_6Mo_7H_4O_{24} \cdot 4H_2O$ en 500 mL de agua destilada. Esta disolución se debe guardar en una botella con tapón de vidrio para preservarse.
- Reactivo D: ácido ascórbico 0,01 M. Es estable durante 1 semana.
- Reactivo combinado: para preparar 100 mL de este reactivo, se mezclan 50 mL de reactivo A, 5 mL de reactivo B, 15 mL de reactivo C y 30 mL de reactivo D. Se debe agitar antes de añadir cada reactivo y se debe mantener el orden. Esta disolución es estable durante 4 horas.

Procedimiento

- Se toma una muestra de 5 mL y se añade 1 gota de fenolftaleína. Si se pone color rojo, se añade el reactivo A gota a gota hasta que el color rojo desaparece.
- Luego se añaden 0,8 mL del reactivo combinado y se agita con un agitador vortex.
- Tras 10 minutos (máximo 30) se mide la absorbancia a 880 nm en un espectrofotómetro Cecil CE 7200.
- Para la calibración se realiza una recta de calibración en el rango 0-1 mg $\text{PO}_4^{3-}\text{-P L}^{-1}$, usando un estándar de KH_2PO_4 .

Interferencias

Las concentraciones de arsenatos de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ pueden reaccionar con el reactivo de molibdato para producir un color azulado similar al formado por el fosfato. El cromo hexavalente y el nitrito pueden suponer errores en la medida del 3% por abajo a concentraciones bajas de 1 mg L^{-1} y entre 10-15% por abajo a concentraciones de 10 mg L^{-1} .

2.1.11 Microcontaminantes

2.1.11.1 Preparación de las muestras

Se tomaron las muestras líquidas en botellas de cristal para pasar por las etapas de filtración, extracción, preparación de la muestra y detección. Para evitar interferencias causadas por sólidos en suspensión, las muestras brutas se filtran con prefiltros de fibra de vidrio (AP004705, Merck Millipore Ltd.) y filtros de membrana ($0,45 \mu\text{m}$, HAWP04700, Merck Millipore Ltd.).

La extracción de fase sólida se empleó para preconcentrar las muestras, separando los analitos por sorción en una fase sólida y desorbiéndolos por elución con un solvente orgánico: etil acetato en el caso de muestras analizadas por cromatografía de gases, y metanol, así como metil terbutil éter para las muestras analizadas por

cromatografía de líquidos. Para maximizar la cantidad de muestras procesadas al mismo tiempo, se empleó un colector de vacío de 24 plazas (Phenomenex UAS).

2.1.11.2 Cromatografía de gases - espectrometría de masas (GC-MS)

Los analitos se determinaron por GC-MS mediante un cromatógrafo de gases Varían CP 3900 conectado a un espectrómetro de masas de trampa de iones (Varían Satum 2100T). La separación se llevó a cabo en una columna capilar ZB-semivolátiles Phenomenex (30 m x 0,25 mm d.i., d.f. 0,25 μ m). Se empleó como gas portador Helio (99,999%) con un caudal constante de 1 mL min⁻¹. Se programó el horno del GC a 70 °C, temperatura que se mantuvo durante 2 minutos, a continuación se subió la temperatura con un programa en rampa, hasta que se alcanzaron 150 °C con una velocidad de calentamiento de 25 °C min⁻¹, a partir de ahí se subió hasta 180 °C a una velocidad de 3 °C min⁻¹, y finalmente se subió hasta 280 °C a 8 °C min⁻¹, mantenido dicha temperatura durante 15 minutos. La interfaz del GC-MS y la trampa de iones se mantuvieron a 280 y 220 °C, respectivamente. El MS se operó en el modo de ionización de impacto de electrones (70eV). El espectro de masas se realizó en el rango de 44-550 unidades de m/z. Las concentraciones de analitos en la muestra se determinaron usando métodos de calibración estándar internos usando Dihidrocarbamecina.

Tabla 2.2. Cuantificación masa-carga (mz) de los compuestos analizados por GC-MS.

Compuesto	Cuantificación mz
IBP	160+263+73
NPX	243
TCS	345+347+349
DCF	352+354+356

2.1.11.3 Cromatografía de líquidos - tandem espectrometría de masas (LC-MS/MS)

La cromatografía de líquidos se realizó con un sistema HPLC Agilent Technologies 1100 Series equipado con una bomba binaria, un desgasificador de vacío y un automuestreador HTC-Pal (CTC Analytics). El cromatógrafo de líquidos estaba acoplado a un espectrómetro de masas triple cuadrupolo API-4000 equipado con una interfaz de pulverización de iones (Applied Biosystems), y se empleó nitrógeno como gas de colisión. La cuantificación de los analitos se realizó

monitorizando las transiciones más intensas en reacciones múltiples. La separación en el LC se llevó a cabo en columnas Synergie Max-RP de 250 mm x 4,6 mm (4 μ m) con cartuchos C12 de Phenomenes a temperatura ambiente. El volumen de inyección se estableció en 5 y 10 μ L para electropulverización (ESI) y presión química atmosférica (APCI), respectivamente. Se usó un gradiente binario que consta de ácido fórmico al 0,1% (v/v) en agua (A) y metanol al 100% (B) a un caudal de 0,7 mL min⁻¹. El gradiente fue, en el caso del ESI, 15% B mantenido durante 3,5 min, aumentado linealmente al 80% en 10 min y mantenido durante 3 min, y se escalonó al 90% y se mantuvo durante 12 min. Se utilizó un paso de equilibrio de 17 min al 15% de B al comienzo de cada análisis para llevar el tiempo total de análisis por muestra a 42 min; en el caso de la fuente de ionización APCI, el gradiente fue 70% de B mantenido durante 0 min, aumentado linealmente a 88% de B por 2 min y luego al 94% de B durante 13 min. Se usó un paso de equilibrio de 7 min al 70% B en al comienzo de cada análisis para llevar el tiempo total de análisis por muestra a 22 min.

Tabla 2.3. Cuantificación masa-carga (mz) y energía de colisión de los compuestos analizados por LC-MSMS.

Compuesto	Cuantificación mz	Energía de colisión (mV)
SMX	254+156	23
TMP	291,1+260,9	35
ROX	837,7+679,3	31
ERY	734,4+158,3	41
FLX	310,1+44,1	37
CBZ	237,1+194	25
DZP	285+154,1	37
E1	271,1+133,2	27
E2	255+159,1	23
EE2	279,2+133,1	23

2.2 FASE SÓLIDA

2.2.1 Sólidos en suspensión totales y volátiles del licor de mezcla (SSTLM y SSVLM)

La concentración de SSTLM indica la cantidad de sólidos en suspensión orgánicos y minerales presentes y se calculó como la suma de sólidos en suspensión totales inertes y SSVLM. Los SSVLM dan información acerca de la cantidad de

materia orgánica presente en el agua residual y la biomasa activa. Ambos parámetros se determinaron siguiendo los métodos 2540 D, para SSTLM y 2540E, para SSVLM, detallados en *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2005).

Procedimiento

Se tomó una muestra homogénea y se filtró a través de un filtro de fibra de vidrio (Whatman, GF/C; diámetro de 4,7 cm y tamaño de poro 1,2 µm). La fracción retenida por el filtro se secó hasta tener un peso constante a 103-105 °C en un horno (Conterm 80L 2000210, J.P. Selecta) durante un mínimo de 2 horas usando cápsulas de aluminio. Antes de filtrar la muestra, el filtro se seca a 550 °C durante 30 minutos en una mufla (Select-Horn 2000367, J.P. Selecta). El aumento de peso del filtro corresponde con la concentración de SSTLM de la muestra. Para determinar la fracción de SSVLM en la muestra, el residuo del filtro se llevó a una mufla durante 30 minutos a 550 °C. La pérdida de peso en este período representa el contenido volátil, quedando en el filtro la fracción inorgánica. La Ecuación 2.6 muestra el cálculo de la concentración de SSTLM, mientras la Ecuación 2.7 muestra lo mismo para SSVLM.

$$SSTLM = \frac{(A-B)}{V} \quad \text{Ecuación 2.6}$$

Donde A es la suma del peso del filtro y la muestra secada a 103-105 °C (g); B es el peso del filtro secado a 550 °C (g); V es el volumen de muestra filtrada (L).

$$SSVLM = \frac{(A-B)}{V} \quad \text{Ecuación 2.7}$$

Donde A es el peso del filtro y residuo antes de secarlos a 550 °C (g); B es el peso del filtro y residuo después de secarlos a 550°C (g); V es el volumen de muestra filtrada (L).

2.3 FASE GAS

2.3.1 Caudal del gas generado

El caudal de gas generado en las etapas anaerobias de los reactores UASB y MBR operados en los laboratorios de la USC se determinaron por medio de un

medidor volumétrico de caudal de gas (MGC-10, Ritter) con un rango de medida de 0,5 a 6 L h⁻¹. El caudal de gas generado por la unidad UASB ubicada en una industria láctea, por ser de mayores dimensiones y generar más caudal, se monitorizó con un medidor volumétrico Ritter análogo al de laboratorio, preparado para medir un mayor caudal de gas.

2.3.2 Composición del gas

La composición del gas se determinó usando un cromatógrafo de gases HP 5890 Series II con una columna Porapak Q 80/100 2m x 1/8" (SUPELCO). Para ello se tomó 1 mL de muestra de la fase gas y se inyectó a través de un septum en las siguientes circunstancias: temperatura del horno (columna) de 35 °C; temperatura del inyector 110 °C y temperatura del detector 110 °C. Los picos de la curva obtenida representan los porcentajes que la muestra contiene de nitrógeno, metano, dióxido de carbono, óxido nitroso y, en su caso, sulfuro de hidrógeno.

2.4 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS

2.4.1 Identificación de poblaciones por FISH

Con esta técnica se buscaron regiones específicas de 16S rRNA mediante sondas etiquetadas que brillan en presencia de luz fluorescente. Si la población objetivo está presente, la sonda se hibrida con la secuencia buscada y se puede detectar a través de un microscopio. La metodología seguida está descrita por Amann et al. (1995). Las etapas seguidas en el protocolo FISH son: 1) fijación y permeabilización; 2) hibridación con las sondas; 3) lavados para eliminar el excedente de las sondas empleadas; 4) evaluación de las células etiquetadas mediante microscopio. La biomasa granular debe ser sonicada para romper los gránulos, pero sin romper las células. Por ello se fija un tiempo de 1 minuto con un 65% de amplitud mediante un sonicador (UP200s, Dr. Hierscher).

Durante la hibridación las células se exponen a temperaturas elevadas, detergentes y gradientes osmóticos. Por ello, la fijación de las células es esencial para mantener su integridad morfológica. La fijación con glutaraldehído puede ocasionar autofluorescencia, por lo que se recomienda usar la disolución de fijación al 4% de paraformaldehído en una disolución tampón de fosfato (PBS) con una antigüedad menor a 24 horas. Después de la fijación, las células se inmovilizan en un

portamuestras de microscopio para la hibridación con las sondas. Para evitar enlaces no específicos de las sondas, la hibridación se lleva a cabo a 48 °C en un ambiente con un 0-65% de formamida y se realizan lavados con un tampón de lavado a 46 °C. Para visualizar el resultado final, se empleó un microscopio Axionskop 2 plus (Zeiss) dotado de una cámara digital Coolsnap (Roper Scientific Photometrics).

Reactivos

- PBS (3x): se disuelven 0,49 g de KH_2PO_4 en 80 mL de agua milliQ, se añaden 2,3 g de NaCl y se ajusta el pH a 7,2. Finalmente, el volumen se ajusta a 100 mL.
- PBS (1x): se prepara una dilución 1:3 de PBS (3x) en agua milliQ.
- Fijador: Se calientan 6,5 mL de agua milliQ a 60 °C y se añaden 0,4 g de paraformaldehído. Se añade 1 gota de NaOH 1 M y se agita fuertemente hasta que se clarifica (sobre 2 minutos). Luego se añaden 3,3 mL de PBS (3x) y se ajusta el pH a 7,2 con HCl (1 gota de HCl 1 M). Se filtra la disolución con un mililitro de membrana de 0,2 μm .
- Tampón de hibridación: se prepara en un eppendorf de 2 mL añadiendo 360 μL de NaCl 5 M, 40 μL de Tris/HCl 1M (pH 8), formamida cuya cantidad se selecciona de acuerdo a la sonda empleada (Tabla 2.2), y 4 μL de dodecilsulfato de sodio 10% (m/v).
- Tampón de lavado: Se prepara en un tubo Falcon de 50 mL. Se añaden 1 mL de Tris/HCl (pH 8) y NaCl 5 M y EDTA 0,5 M según la Tabla 2.3. Se rellena el tubo Falcon con agua milliQ.

Tabla 2.4. Formamida añadida al tampón de hibridación.

% (v/v) Formamida	Formamida (μL)	Agua milliQ (μL)
0	0	1600
5	100	1500
10	200	1400
15	300	1300
20	400	1200
25	500	1100
30	600	1000
35	700	900
40	800	800
45	900	700
50	1000	600
55	1100	500
60	1200	400
65	1300	300

Tabla 2.5. Cantidades de NaCl y EDTA añadidas al tampón de lavado.

% (v/v) Formamida	[NaCl] (M)	5 M NaCl (μL)	0.5 M EDTA (μL)
0	0.9	9000	-
5	0.636	6300	-
10	0.450	4500	-
15	0.318	3180	-
20	0.225	2250	500
25	0.159	1590	500
30	0.112	1120	500
35	0.08	800	500
40	0.056	560	500
45	0.04	400	500
50	0.028	280	500
55	0.02	200	500
60	0.008	80	500
70	0.0	0	350

Procedimiento fijación

- Se toma la muestra y se realizan 3 lavados y resuspensiones con PBS (1x).

- Se añaden 3 volúmenes de fijador por 1 volumen de muestra. Se mantiene de 1 a 3 horas en refrigeración a 4 °C.
- Se lava y resuspende 3 veces con PBS (1x).
- Se añade 1,25 volúmenes de etanol 98% a -20 °C a la muestra resultante.
- Guardar la muestra a -20 °C.

Procedimiento inmovilización

- Se añaden 2-15 µL de muestra (según necesidad) en cada celda del portamuestras del microscopio.
- Se seca a 46 °C durante 10 minutos.
- Se deshidratan las células con lavados sucesivos con etanol 50, 80 y 96% dejando cada uno actual durante 3 minutos.
- Se seca el portamuestras a temperatura ambiente y etiquetándolo y se guarda a -20 °C.

Procedimiento hibridación

- Se prepara tampón de hibridación.
- Se descongelan las sondas de hibridación.
- Se prepara un tubo Falcon de 50 mL con una base de papel en su interior para el portamuestras, para poner el excedente del tampón de hibridación sobre el soporte de papel.
- Se añaden 10 µL del tampón de hibridación en cada celda del portamuestras.
- Se añade 1 µL de la sonda o sondas en cada celda sin tocar el portamuestras.
- Se pone el portamuestras dentro del tubo Falcon e incubar durante 1,5 horas a 46 °C.

- Se prepara el tampón de lavado y precalentarlo a 48 °C.
- El portamuestras se pasa por tampón de lavado, y se incuba durante 10-20 minutos a 48 °C.
- Se elimina el exceso de tampón de lavado con agua milliQ y se seca el portamuestras.
- Las celdas se tiñen con Vectashield y se pone el cubre portamuestras.
- Finalmente se visualiza en el microscopio.

Sondas empleadas

Tabla 2.6. Sondas de FISH empleadas en esta tesis.

Sonda	Secuencia de la sonda 5' → 3'	% FA	Organismos buscados	Ref. ^a
EUB 338	GCTGCCTCCCG TAGGAGT	0-50	Dominio de bacterias	[1]
EUB338 II	GCAGCCACCCG TAGGTGT	0-50	<i>Planctomicetales</i>	[2]
EUB 338 III	GCTGCCACCCG TAGGTGT	0-50	<i>Verrucomicrobiales</i>	[2]
Amx 368	CCTTTCGGGCA TTGCGAA	15	Todas las bacterias anammox	[3]
MG 84	CCACTCGTCAG CGCCCGA	20	Metanótrofos tipo I	[4]
MG 705	CTGGTGTTTCCTT CAGATC	20	Metanótrofos tipo I	[4]
MA450	ATCCAGGTACC GTCCATTATC	20	Metanótrofos tipo II	[4]
DBACT 193	CGCTCGCCCCC TTTGGTC	45	Bacterias DAMO	[5]
DBACT 1027	TCTCCACGCTC CCTTGCG	40	Bacterias DAMO	[5]
DARCH 872	GGCTCCACCCG TTGTAGT	40	Arqueas DAMO	[6]

Referencias ^a: [1] (Amann et al., 1990); [2] (Daims et al., 1999); [3] (Manz et al., 1992); [4] (Eller et al., 2001); [5] (Raghoebarsing et al., 2006); [6] (STAHL and A., 1991).

2.4.2 Determinación de diversidad microbiana mediante secuenciación de genes

Se realizaron análisis metagenómicos del gen 16S rARN mediante Illumina. Se tomaron muestras homogéneas en tubos Eppendorf esterilizados de 1,5 mL. Las muestras se guardaron congeladas a -20 °C. En el caso de la biopelícula, los soportes fueron lavados con agua destilada para eliminar restos de biomasa en suspensión para ser sonicados (UP 200 S, Dr. Hielscher) sumergidos en agua destilada y extraer la biopelícula adherida durante 1 minuto. El ADN genómico se extrajo de la biomasa usando el kit de extracción Stool DNA Isolation Kit (Norgen, Thorold, Canada), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las concentraciones de ADN total se cuantificaron en un fluorómetro Qubit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) y comprobada su integridad por electroforesis estándar. Los fragmentos del 16S rARN se amplificaron para el dominio de Bacterias, con marcadores que incluyen adaptadores de Illumina y códigos de barras. La región V3V4 del gen bacteriano 16S rARN se amplificó con el marcador formado por la pareja S-D-Bact-0341-b-S-17 y S-D-Bact-0785-a-A siguiendo la metodología descrita previamente (Klindworth et al., 2013). Se comprobaron las bibliotecas Amplicon de ADN para la calidad del tamaño, concentración e integridad usando un bioanalizador (Bioanalyzer, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Los fragmentos amplificados se secuenciaron en una plataforma Illumina MiSeq (Parque Científico de Madrid, España).

La secuenciación del gen 16S rARN y los análisis de las secuencias se realizaron siguiendo el protocolo descrito previamente por Braz et al. (Braz et al., 2018). Las secuencias se clasificaron en Unidades Taxonómicas operacionales (OTUs) con una similitud del 97% y se clasificaron taxonómicamente según la base de datos Greengenes (DeSantis et al., 2006).

2.5 BIBLIOGRAFÍA

- Amann, R.I., Krumholz, L., Stahl, D.A., 1990. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *J. Bacteriol.* 172, 762–770.
<https://doi.org/10.1128/jb.172.2.762-770.1990>
- Amann, R.I., Ludwig, W., Schleifer, K.H., 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* <https://doi.org/10.1128/mbr.59.1.143-169.1995>

- APHA, 2005. Standard Methods for Examination of Water and Wastewater, 21st ed. American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation, Washington DC.
- Bower, C.E., Holm-Hansen, T., 1980. A Salicylate–Hypochlorite Method for Determining Ammonia in Seawater. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 37, 794–798. <https://doi.org/10.1139/f80-106>
- Braz, G.H.R., Fernandez-Gonzalez, N., Lema, J.M., Carballa, M., 2018. The time response of anaerobic digestion microbiome during an organic loading rate shock. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102, 10285–10297. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9383-9>
- Daelman, M.R.J., van Voorthuizen, E.M., van Dongen, U.G.J.M., Volcke, E.I.P., van Loosdrecht, M.C.M., 2012. Methane emission during municipal wastewater treatment. *Water Res.* 46, 3657–3670. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.04.024>
- Daims, H., Brühl, A., Amann, R., Schleifer, K.H., Wagner, M., 1999. The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all bacteria: Development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Syst. Appl. Microbiol.* 22, 434–444. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(99\)80053-8](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(99)80053-8)
- DeSantis, T.Z., Hugenholtz, P., Larsen, N., Rojas, M., Brodie, E.L., Keller, K., Huber, T., Dalevi, D., Hu, P., Andersen, G.L., 2006. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 5069–5072. <https://doi.org/10.1128/AEM.03006-05>
- Eller, G., Stubner, S., Frenzel, P., 2001. Group-specific 16S rRNA targeted probes for the detection of type I and type II methanotrophs by fluorescence in situ hybridisation. *FEMS Microbiol. Lett.* 198, 91–97. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2001.tb10624.x>
- Klindworth, A., Priesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., Glöckner, F.O., 2013. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res.* 41, e1–e1. <https://doi.org/10.1093/nar/gks808>
- Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Wagner, M., Schleifer, K.H., 1992. Phylogenetic Oligodeoxynucleotide Probes for the Major Subclasses of Proteobacteria: Problems and Solutions. *Syst. Appl. Microbiol.* 15, 593–600. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(11\)80121-9](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(11)80121-9)

- Raghoebarsing, A.A., Pol, A., Van De Pas-Schoonen, K.T., Smolders, A.J.P., Ettwig, K.F., Rijpstra, W.I.C., Schouten, S., Sinninghe Damsté, J.S., Op Den Camp, H.J.M., Jetten, M.S.M., Strous, M., 2006. A microbial consortium couples anaerobic methane oxidation to denitrification. *Nature* 440, 918–921. <https://doi.org/10.1038/nature04617>
- Sander, R., 2015. Compilation of Henry's law constants (version 4.0) for water as solvent. *Atmos. Chem. Phys.* 15, 4399–4981. <https://doi.org/10.5194/acp-15-4399-2015>
- Soto, M., Veiga, M.C., Méndez, R., Lema, J.M., 1989. Semi-micro C.O.D. determination method for high-salinity wastewater. *Environ. Technol. Lett.* 10, 541–548. <https://doi.org/10.1080/09593338909384770>
- Souza, C.L., Chernicharo, C.A.L., Aquino, S.F., 2011. Quantification of dissolved methane in UASB reactors treating domestic wastewater under different operating conditions. *Water Sci. Technol.* 64, 2259–2264. <https://doi.org/10.2166/wst.2011.695>
- STAHL, A., D., 1991. Development and application of nucleic acid probes. *Nucleic acid Tech. Bact. Syst.*

CAPÍTULO 3

ELIMINACIÓN DE MACRO Y MICROCONTAMINANTES DE AGUAS RESIDUALES, MEDIANTE EL SISTEMA INTEGRADO SIAL, FORMADO POR REACTOR UASB Y POSTRATAMIENTO IFAS

Resumen

En este capítulo se presenta un proceso innovador, que se denominará proceso SIAL, basado en la combinación de un primer reactor UASB y un sistema de postratamiento con reactor híbrido de lodos activos y biopelículas (IFAS) con el fin de combinar diferentes condiciones redox y conformaciones de biomasa para promover una alta diversidad microbiana. El objetivo de esta configuración es lograr la eliminación del nitrógeno mediante el uso del metano disuelto como un dador de electrones de bajo coste y mejorar la eliminación biológica de microcontaminantes orgánicos (OMP). Los resultados mostraron altas eliminaciones de DQO (93%); el metano disuelto presente en el efluente UASB (hasta un 85%) se eliminó, fundamentalmente, por un consorcio de microorganismos metanótrofos aeróbicos y desnitrificantes heterótrofos, detectándose una baja presencia de metanótrofos anaerobios, bacterias n-damo. La eliminación de nitrógeno total disminuyó levemente a lo largo de la operación, del 44% al 33%, dependiendo del anión de nitrógeno disponible, concentración de biomasa y presencia de flóculos y/o biopelícula. Se logró una alta eliminación (> 80%) de 6 de los OMP estudiados; el sulfametoxazol, trimetoprim, naproxeno y estradiol se biotransformaron con facilidad en el UASB anaerobio, mientras que OMP como ibuprofeno o el bisfenol A se eliminaron fundamentalmente en los compartimentos anóxico-aeróbico del postratamiento IFAS. Se han encontrado pruebas de la biotransformación cometabólica de los OMP, como la influencia de la actividad de nitrificación en la eliminación de bisfenol A y de la actividad de desnitrificación en la eliminación de etinilestradiol. Todo ello pone de manifiesto la utilidad de proporcionar diferentes condiciones redox para lograr una elevada eliminación de diversos OMP que no tengan un carácter recalcitrante.

Parte de este capítulo ha sido publicado en: A. Arias, T. Alvarino, T. Allegue, S. Suárez, J.M. Garrido, F. Omil, 2018. An innovative wastewater treatment technology based on UASB and IFAS for cost-efficient

macro and micropollutant removal. J. Hazard. Mater. 359, 113–120. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.07.042>. Department of Chemical Engineering, School of Engineering, University of Santiago de Compostela, Campus Vida, Santiago de Compostela, E-15782, Spain. Factor de Impacto: 6.4. Categoría revista: Q1. Editorial Elsevier. Una parte del **Capítulo 3** ha sido publicado en este artículo. Contribución a la publicación: Conceptualización, Investigación, Escritura borrador original.



ÍNDICE DE CONTENIDOS - CAPÍTULO 3

3.1 INTRODUCCIÓN	61
3.2 MATERIALES Y MÉTODOS	65
3.2.1 Equipo experimental	65
3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	68
3.3.1 Resultados generales en el sistema UASB	68
3.3.2 Eliminación de metano y nitrógeno en el postratamiento IFAS	69
3.3.3 Análisis microbiológicos	73
3.3.4 Eliminación de microcontaminantes orgánicos	75
3.4 CONCLUSIONES	81
3.5 BIBLIOGRAFÍA	82



3.1 INTRODUCCIÓN

Uno de los objetivos clave en el tratamiento de aguas residuales, consiste en la optimización y la reducción de costes de operación, asociados principalmente al consumo de energía asociada a los sistemas de aireación de los sistemas de tratamiento de lodos activos, usados habitualmente para el tratamiento de aguas residuales de baja carga contaminante. Para reducir este coste, se están desarrollando conceptos innovadores basados en bajas aireaciones en los procesos aerobios (Wang D. et al., 2021; Wang L. et al., 2021), en el uso de sistemas combinados con etapas biológicas anaerobias y aerobias (Feng et al., 2021; Sánchez et al., 2016; Silva-Teira et al., 2020), o sistemas de lodos activos de alta carga (Ge et al., 2017; Jimenez et al., 2015). En todos los casos se persigue una disminución de los requerimientos de energía, asociados a los requerimientos de oxígeno de la aireación, limitando la oxidación aerobia de la materia orgánica, promoviendo además la metanización de una parte de esta, ya sea en línea de agua (sistemas combinados anaerobios-aerobios), o en línea de lodos (reactores de alta carga). Además, la valorización del biogás permitiría generar energía eléctrica y/o térmica que se podría aprovechar en la instalación, reduciendo aún más el consumo de energía.

El empleo de reactores anaerobios en línea de agua, operados a temperatura ambiente, mejorarían considerablemente el balance neto de energía debido al no tener consumo de energía asociados a la aireación y a la recuperación de energía mediante la producción de biogás, además de una menor generación de lodos, en comparación con sistemas de lodos activos convencionales. El uso de sistemas anaerobios, como sistema único de tratamiento biológico de aguas residuales urbanas, es habitual en países de zonas cálidas y templadas del planeta (Chernicharo et al., 2015), usando habitualmente el reactor de manto de lodos de flujo ascendente (Upflow Anaerobic Sludge Blanket, UASB). Aunque a primera vista esto parece dar respuesta a la implantación de sistemas de tratamiento con bajos requerimientos de energía, un análisis más detallado de su comportamiento daría como señal de alarma la baja calidad de los efluentes tratados y como paradoja, una alta emisión de Gases de Efecto Invernadero (GEIs).

Para una serie de efluentes de reactores anaerobios UASB se calculó que las pérdidas de metano disuelto, en el efluente oscilaban entre el 36 y 41% del metano generado (Souza et al., 2011), pudiendo llegar a suponer más del 60% del metano producido en reactores UASB y/o reactores anaerobios de película fija a bajas

temperaturas (Noyola et al., 2006). Los efluentes de los sistemas UASB presentan un contenido elevado de contaminantes orgánicos y la práctica totalidad del nitrógeno del agua residual, por lo que es práctica habitual incluir una etapa de postratamiento, para reducir el contenido de materia orgánica, sólidos en suspensión y parte de la carga nitrogenada, pudiendo usarse como sistemas de postratamiento filtros anaerobios (Chernicharo and Machado, 1998), lagunas (Cavalcanti et al., 2001), filtros percoladores, sistemas de lodos activos (Von Sperling et al., 2001) o reactores de lecho fijo aireado (Sumino et al., 2007), entre otros. Los tratamientos aerobios son la alternativa más común como postratamiento, sin embargo, una fracción del metano disuelto es emitido a la atmósfera por desorción, incrementando las emisiones de GEIs de los tratamientos de aguas residuales (Cakir and Stenstrom, 2005). Por otro lado, si se desea eliminar nitrógeno, el uso de procesos convencionales de nitrificación-desnitrificación podrían verse limitados por el bajo contenido de materia orgánica después de tratamientos anaerobios, limitando la eficiencia de desnitrificación.

Existe un consorcio de microorganismos bacteria/arquea metanótrofos, aerobios y anaerobios, que pueden emplear el metano como fuente de carbono para desnitrificación (Ettwig et al., 2010). Los microorganismos metanótrofos aerobios pueden transformar el metano en especies de oxidación parcial, que a su vez pueden ser empleadas como fuente de carbono por bacterias heterótrofas desnitrificantes (Zhu et al., 2016). En ausencia de oxígeno, la desnitrificación acoplada a oxidación anaerobia de metano puede ser llevada a cabo tanto por bacterias N-damo (*Candidatus Methylobirabilis oxyfera*) como por arqueas N-damo (*Candidatus Methanoperedens nitroreducens*), usando respectivamente nitrito o nitrato como aceptor de electrones, (Chen et al., 2016). En este sentido, desde la Universidade de Santiago de Compostela se ha concebido un sistema novedoso, el proceso SIAM (patente UE EP2952483A3), que implica el tratamiento de aguas residuales mediante la combinación de un primer proceso biológico metanogénico UASB y un postratamiento, mediante un biorreactor de membrana (MBR) (Sánchez et al., 2016). Este proceso estimula el uso de metano disuelto como fuente de carbono para la desnitrificación biológica, reduciendo tanto las emisiones de GEIs a la atmósfera como el contenido de nitrógeno (NT) en las aguas residuales tratadas. Mediante el proceso SIAM la emisión de GEI y TN asociado al tratamiento de aguas residuales de baja carga disminuye, lo que lo convierte en una alternativa de tratamiento respetuosa con el medio ambiente (Alvarino et al., 2019; Sánchez et al., 2016; Silva-Teira et al., 2017). Aunque la tecnología de MBR integrada en el sistema SIAM es quizás una de las Mejores Tecnologías Disponibles (MTD) a la hora de obtener un agua de alta calidad, que

facilite la reutilización de la misma, uno de los inconvenientes que presentaría el sistema SIAM, se derivaría del uso de membranas de filtración para la separación del agua tratada y el lodo biológico, que implica un aumento de la complejidad del sistema de depuración y los costes de operación asociadas al uso de membranas de filtración.

Como alternativa al sistema SIAM, se propone en el presente capítulo un esquema de tratamiento similar, la tecnología SIAL (Sistema Integrado Anaerobio metanogénico sistema de Lodos activos híbrido) en la que se reemplazan las membrana de filtración del sistema SIAM, por una unidad de clarificación secundaria y donde se persigue igualmente el emplear metano disuelto presente en efluentes anaerobios como dador de electrones para desnitrificar (Allegue et al., 2020).

Otro de los retos que se plantean en depuración de aguas residuales está asociado a la presencia de microcontaminantes orgánicos en las masas de agua (Dubey et al., 2021; Tran et al., 2018). Los efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales convencionales se consideran como el principal foco de entrada de estos compuestos a las masas de agua, debido a que los procesos de tratamiento convencionales no son capaces de eliminar efectivamente muchos de estos compuestos (Fernández et al., 2014; Liu et al., 2017). Por tanto, el tratamiento de las aguas residuales debe abordar, no solo los contaminantes convencionales como pueden ser materia orgánica y nutrientes, sino también la potencial eliminación, absorción o volatilización de microcontaminantes orgánicos en las EDAR.

En los últimos años se han desarrollado procesos de tratamiento avanzados para vencer las limitaciones de procesos convencionales, muchos de los cuales consisten en la combinación de procesos biológicos con etapas de postratamiento físico-químicas (Altmann et al., 2014; Alvarino et al., 2016a; Beijer et al., 2017). Se pueden obtener elevadas tasas de eliminación de microcontaminantes orgánicos aplicando sistemas de tratamiento biológicos acoplados con etapas de tratamiento terciario usando agentes oxidantes, como ozono, o materiales adsorbentes, como el uso y la aplicación de carbón activo granular (GAC) en columnas de lecho fijo o carbón activo en polvo (PAC). Sin embargo, la aplicación de estas mejoras en los sistemas de tratamiento de agua residual incrementa sus costes operacionales (De Gisi et al., 2016; Nielsen et al., 2013). Una alternativa para disminuir estos costes sería el desarrollo nuevas configuraciones de procesos biológicos que mejoren la eliminación de micro y macrocontaminantes, aproximándolos a las observadas en dichos sistemas de postratamiento terciarios. En este sentido, son varios los estudios recientes que han

mostrado interés por nuevas configuraciones biológicas que combinan diferentes ambientes redox (anaerobio, anóxico y aerobio) (Alvarino et al., 2016b), diferentes conformaciones físicas de biomasa (floculenta, en biopelículas y granular) y una amplia diversidad microbiana (Escolà Casas et al., 2015), de forma que mejoren la eliminación observada de microcontaminantes orgánicos en sistemas biológicos convencionales.

La biotransformación de los microcontaminantes orgánicos se establece de acuerdo a su estructura química y está influenciada por las condiciones redox (Alvarino et al., 2018). Como reseña, el sulfametoxazol presenta una elevada biotransformación, por medio de condiciones anaerobias y debido a la presencia de grupos aceptores de electrones en su estructura, como radicales sulfonilo, fácilmente degradables en condiciones reductoras (Alvarino et al., 2014). Por otro lado, el ibuprofeno es un microcontaminante fácilmente biotransformable bajo condiciones aerobias (Jia et al., 2021), proceso favorecido en especial cuando el proceso de nitrificación se lleva a cabo mediante su hidroxilación por acción de la encima amonio mono oxigenasa (AMO) para producir 2-hidroxi-ibuprofeno (Fernandez-Fontaina et al., 2016). Por el contrario, las sustituciones ramificadas que existen en la posición para- del anillo aromático dificultan su biotransformación bajo condiciones anaerobias (Alvarino et al., 2014), donde apenas se degrada. Habitualmente, la combinación de etapas aerobias y anaerobias permite mejorar la eliminación de diversos microcontaminantes orgánicos, como es el caso de venlafaxina o tramadol (Falås et al., 2016).

El uso de soportes de biopelícula promueve la retención de microorganismos de crecimiento lento en las biopelículas, como los nitrificantes, permitiendo incrementar la diversidad microbiana (Di Trapani et al., 2014; Jiang et al., 2018). La presencia de bacterias nitrificantes mejora la eliminación de varios microcontaminantes orgánicos, como la hormona estradiol, relacionada con la actividad nitrificante (Alvarino et al., 2014). Falas et al. (2012) estudió la eliminación de microcontaminantes orgánicos en biomasa en suspensión y biopelícula, obteniendo velocidades de eliminación por unidad de biomasa mayores en biopelícula en comparación con biomasa en suspensión para la mayoría de los compuestos estudiados, como fue el caso del ketoprofeno y gemfibrozil. Las diferentes configuraciones de la biomasa tienen influencia sobre la eliminación de microcontaminantes orgánicos; en el caso de compuestos lipofílicos, como por ejemplo fragancias de almizcle, se han observado coeficientes de sorción (K_d) mayores en biorreactores de membranas en comparación

con sistemas convencionales de lodos activos, debido al menor tamaño de partícula desarrollado en la biomasa de biorreactores de membrana (Reif et al., 2011). De la Torre et al. (2015) comparó la eliminación en reactores operados tanto con biomasa en suspensión como con biopelícula, así como la combinación de ambas. En esa investigación se observó que los mejores resultados, en términos de eliminación de microcontaminantes orgánicos, se obtuvieron para un sistema integrado de lodos activos con biopelícula fija y biorreactor de membrana con biomasa en suspensión; los peores resultados se obtuvieron en el reactor operado únicamente con biopelícula. El empleo de membranas y soportes permiten la retención de bacterias de crecimiento lento (Alvarino et al., 2016b; Clara et al., 2005), promoviendo la diversidad microbiana y los tipos de enzimas presentes en la biomasa, lo que redundaría en una mejora de la eliminación de micro y macrocontaminantes (Alvarino et al., 2018).

El objetivo del presente estudio fue investigar la eliminación de microcontaminantes orgánicos (OMP), materia orgánica, nitrógeno total y metano disuelto, en un sistema SIAL en el que se combina un reactor anaerobio de manto de lodo de flujo ascendente (UASB) con un sistema híbrido de lodos activos con película fija integrada (IFAS), tratando agua residual de baja carga. El sistema combina condiciones redox anaerobias, anóxicas y aerobias en una secuencia de reactores, donde la biomasa se desarrolla en diferentes configuraciones (granular, floculenta y biopelícula).

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 Equipo experimental

Se ha evaluado un prototipo a escala piloto, que se denominará sistema SIAL (Sistema Integrado Anaerobio metanogénico e híbrido de Lodos activos y biopelículas) compuesto por una primera unidad anaerobia UASB de 120L de volumen, seguido de una etapa de afino mediante un sistema híbrido de lodos activos con biopelículas, IFAS, de 56L (Figura 3.1 y 3.2). El reactor anaerobio se inoculó con biomasa granular anaerobia procedente de un sistema con circulación interna de un reactor para el tratamiento de agua residual de la industria cervecera (Biopaq IC), mientras que el postratamiento fue inoculado con biomasa floculenta obtenida del MBR operado por Silva-Teira et al. (2017). El arranque de la etapa UASB se realiza en el día de operación 0, mientras que el del sistema IFAS se puso en marcha en el día de operación 26. El sistema IFAS se compone de 2 compartimentos

biológicos conectados en serie, anóxico de 36L, y aerobio de 20L, seguidos de un decantador secundario de 10L de volumen y 1,8 dm² de superficie útil.

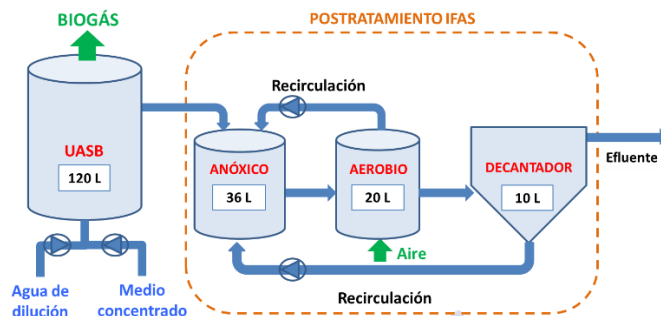


Figura 3.1. Esquema de la unidad SIAL, con una primera etapa UASB y segunda con un reactor IFAS: La etapa IFAS utilizada como sistema de postratamiento del efluente del UASB, consta de un primer compartimento anóxico con soportes Levapor, un segundo compartimento aerobio con soportes Biochip y un decantador secundario.

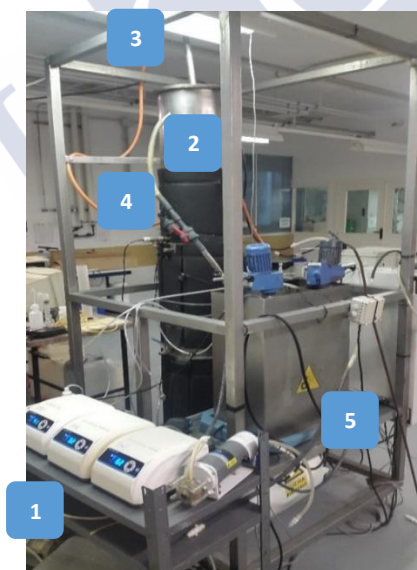


Figura 3.2. Imagen de la planta piloto del sistema integrado UASB-IFAS: 1) Controladores de las bombas y bombas de alimentación y recirculaciones; 2) Reactor UASB; 3) Salida de biogás del reactor UASB; 4) Conducto que lleva el efluente UASB a postratamiento; 5) Postratamiento IFAS con compartimentos anóxico y aerobio y decantador secundario.

En el compartimento anóxico se dispuso agitación mecánica en continuo, mientras en compartimento aerobio se agita y airea por medio de 2 soplantes GP-30S (Hiblow) con el propósito de promover la correcta mezcla de la biomasa en suspensión y partículas con biopelículas adheridas. Se emplearon 2 tipos de soportes para promover el crecimiento de biopelícula y retener microorganismos de crecimiento lento: partículas de Levapor (Levapor GmbH, Alemania) soporte de espuma sintética porosa en el compartimento anóxico, y soportes semiflexibles porosos (Mutag Biochip, Multi Umwelttechnologie A.G., Alemania) en el compartimento aerobio. El soporte de biopelícula seleccionado para el compartimento anóxico del postratamiento IFAS, Levapor, es una espuma de poliuretano, con una porosidad elevada (75-90%) y un tamaño de $20 \times 20 \times 7$ mm y superficie específica externa de $486 \text{ m}^2 \text{ m}^{-3}$ de soporte. Este soporte fue seleccionado para promover el crecimiento de microorganismos anóxicos y anaerobios en los poros internos de dichas esponjillas. Por otro lado, el soporte empleado en el compartimento aerobio, Biochip, es de polietileno y tiene una forma redondeada, con un diámetro de 23 mm y un espesor de 1 mm. Su superficie presenta un gran número de huecos y cavidades donde los microorganismos crecen adheridos. El soporte Biochip, con su gran superficie específica externa, $2170 \text{ m}^2 \text{ m}^{-3}$ de soporte, fue seleccionado para promover el crecimiento de una fina biopelícula con un gran número de microorganismos aerobios.

El sistema IFAS se puso en marcha con un volumen aparente de Levapor del 20% y de Biochip del 7%. En el día de operación 257, esos volúmenes se incrementaron hasta el 23 y el 20%, respectivamente.

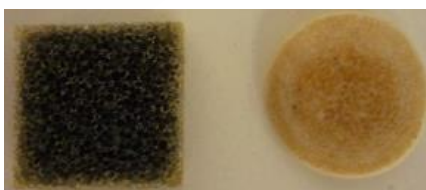


Figura 3.3. Soportes esponja Levapor (izquierda) y plástico semi-rígido Biochip (derecha).

El sistema operó durante 407 días a temperatura ambiente (21 ± 1 °C) con caudal de $140 \pm 12 \text{ L d}^{-1}$. La unidad anaerobia UASB se alimentó con un medio sintético simulando agua residual de baja carga compuesto por leche desnatada, diluida con agua de red como fuente de carbono (DQO_T y DQO_S 891 ± 214 y $782 \pm 204 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente), bicarbonato de sodio para mantener alcalinidad (960 mg L^{-1}) y cloruro de amonio como fuente de nitrógeno (18 mg L^{-1}). El TRH fue de 20 ± 2 h en

el UASB y de 9 ± 1 h en el postratamiento IFAS. Se aplicó una ratio de recirculación total (R) de 3 en el postratamiento para alcanzar eliminaciones altas de nitrógeno, combinando tanto recirculación interna como externa (1,5 cada una de ellas) hacia el compartimento anóxico.

3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1 Resultados generales en el sistema UASB

El sistema integrado SIAL se alimentó con un caudal entre 110 e 164 L d⁻¹, que se mantuvo a lo largo de la experimentación. El TRH total aplicado al sistema integrado fue de 30 ± 3 h, siendo el TRH referido a la etapa anaerobia de 21 ± 2 h. La velocidad de carga de DQO media alimentada al sistema fue de $1,0 \pm 0,3$ g DQO L⁻¹ d⁻¹, con unas concentraciones medias de DQO_T y DQO_S de 882 ± 211 y 776 ± 203 mg O₂ L⁻¹.

La etapa anaerobia alcanzó una eliminación de DQO_T del $93 \pm 2\%$ en el reactor UASB, que coincide con la eliminación global de DQO alcanzada en el sistema integrado SIAL. La producción de gas medida en el UASB fue de 37 ± 9 L d⁻¹ con una composición en metano de $75 \pm 2\%$, nitrógeno $9 \pm 3\%$, y CO₂ $15 \pm 3\%$. La mayor parte de la DQO, en torno al 74%, se transformó en metano en la primera etapa de tratamiento en el UASB bajo condiciones anaerobias metanogénicas. El efluente del UASB se caracterizó por bajos valores de DQO_T y DQO_S, 57 ± 2 mg L⁻¹ y 43 ± 1 mg L⁻¹, respectivamente, sin considerar el metano disuelto, y la concentración de sólidos en suspensión totales en el manto de lodos del reactor UASB, fue de 30 g L⁻¹, sin que se realizasen purgas de lodos del mismo a lo largo de todo el período experimental.

Durante toda la experimentación se detectó una concentración de metano disuelto, en el efluente del UASB, comprendida entre 18 ± 3 mg L⁻¹, siendo esta concentración similar a la de saturación que se prevé en fase líquida, 15-20 mg/L, teniendo en cuenta la presión parcial de metano en el biogás generado y temperatura de operación.

Entre el 10 y el 20 % del del metano producido abandona el sistema UASB disuelto en el efluente, siendo estos resultados menores que los obtenidos por Souza et al. (2011) y similares a los obtenidos por Sánchez et al. (2016) en los periodos de operación donde no se eliminó el metano disuelto del efluente del reactor UASB. La

presencia de metano disuelto sigue siendo una preocupación debido al incremento que produce de las emisiones de GEI. Por ello, el efluente del UASB debería ser tratado posteriormente con el fin de disminuir su impacto ambiental.

3.3.2 Eliminación de metano y nitrógeno en el postratamiento IFAS

El TRH aplicado al postratamiento IFAS, integrado dentro del sistema SIAL, fue de 10 ± 2 h. Las concentraciones de DQO_T y DQO_S alimentadas al sistema de postratamiento durante toda la experimentación fueron de tan solo 57 ± 15 y 42 ± 12 mg O_2 L^{-1} . Estos valores no variaron a lo largo de la operación, por lo que se asume que la materia orgánica presente en el efluente del reactor UASB y aplicada al postratamiento IFAS presenta una baja biodegradabilidad. En esta determinación no se incluye la DQO que aporta el metano disuelto.

Considerando la evolución del proceso de nitrificación, se distinguieron 2 periodos operacionales diferentes en el postratamiento IFAS: Periodo 1 (P1), desde el día 0 hasta el día 167, donde solamente se pudo observar una nitrificación parcial y el nitrito fue el principal aceptor de electrones bajo condiciones anóxicas. Al final del P1 se detectó el desarrollo de bacterias nitrito oxidantes; y el Periodo 2 (P2), desde el día 168 hasta el día 407, en el que se alcanzó la oxidación de nitrito a nitrato y no se observó acumulación de nitrito.

Durante el P1, en el reactor hubo presencia tanto de biomasa en suspensión como de biopelícula en los compartimentos anóxico y aerobio. Las concentraciones de Sólidos en Suspensión Totales y Volátiles en el Licor de Mezcla (SSTLM y SSVLM) en el compartimento anóxico fueron respectivamente de $1,5 \pm 0,9$ g L^{-1} y $1,3 \pm 0,8$ g L^{-1} . El oxígeno disuelto y el potencial oxidación-reducción, determinados en esta cámara estuvieron comprendidos entre 0,15 y 0,31 mg L^{-1} para oxígeno disuelto y entre 0 y -150 mV para potencial de oxidación-reducción. El pH fue $7,6 \pm 0,2$. El oxígeno disuelto en el compartimento aerobio fue de $3,2 \pm 0,9$ mg L^{-1} . Al final de P1 se observaron que las propiedades de sedimentación del lodo eran peores, lo que derivó en un lavado casi completo de la biomasa en suspensión, presente en el postratamiento IFAS (días de operación 146-167).

Durante el periodo P2 la concentración de la biomasa en suspensión fue menor de 50 mg L^{-1} y se observó el crecimiento de biopelícula en los dos tipos de soportes. por lo que se podría considerar que a partir del día 167 de operación, el sistema IFAS

CAPÍTULO 3

carente ya de biomasa en suspensión, quedo reducido a un reactor biológico de lecho móvil (MBBR). En el compartimento anóxico, los valores de oxígeno disuelto y potencial oxidación-reducción variaron desde 0,25 a 0,45 mg L⁻¹ y desde 0 a -75 mV, respectivamente.

La calidad del efluente del postratamiento IFAS, en términos de DQO_T, fue peor en P1 con respecto a P2, con valores de 77 ± 55 mg L⁻¹ y 52 ± 19 mg L⁻¹, respectivamente. La DQO_S fue 24 ± 13 mg L⁻¹ durante toda la experimentación, mientras que la concentración de SSV en el efluente fue menor en P2, 32 ± 11 mg L⁻¹, comparando su valor con P1, 50 ± 40 mg L⁻¹. No se observaron diferencias en la DQO alimentada al postratamiento durante P1 y P2, ni variaciones en la DQO_S en el efluente final del sistema, por lo que esas diferencias en la DQO_T se asocian a la DQO aportada por los SSV del lavado de la biomasa en el efluente final. Por el contrario, el valor de concentración de NT observado en el efluente durante P1 fue más bajo que en P2, con valores de 30 ± 7 mg L⁻¹ y 37 ± 7 mg L⁻¹, respectivamente. La relación A/M aplicada fue baja, situándose en torno a 0,05 g DQO g⁻¹ SSVLM d⁻¹ (Ecuación 3.1), teniendo en cuenta que no se ha observado eliminación de DQO total en el sistema IFAS y una muy baja de DQO soluble, un 18-42%, se puede concluir que el lavado de biomasa en suspensión se ha visto provocado por la muy baja disponibilidad de materia orgánica para el lodo.

$$A/M = \frac{S_o}{TRH \times X} \quad (\text{Ecuación 3.1})$$

En cuanto a la eliminación de nitrógeno, la concentración de amonio medida en el agua residual a la entrada de la etapa IFAS del sistema SIAL, fue 54 ± 8 mg L⁻¹. El postratamiento IFAS contribuyó a alcanzar un efluente de mayor calidad, cuya concentración de nitrógeno total fue de 36 ± 11 mg L⁻¹ para el periodo global de toda la operación. Durante el período P1, la concentración de iones de nitrógeno, presentes en el efluente final del sistema SIAL fue de 28 ± 16 mg NH₄⁺-N L⁻¹ y 2,5 ± 1,8 NO₂⁻-N L⁻¹. Después del día de operación 28, la concentración de NT en el efluente fue de 30 ± 7 mg L⁻¹, con una eliminación de NT del 44%, que se corresponde con una velocidad de eliminación de nitrógeno de 55 ± 18 mg N L⁻¹ d⁻¹, referido a todo el postratamiento IFAS. El ion amonio se oxidó de forma incompleta a nitrito, detectándose trazas de nitrato, con una velocidad de nitrificación observada de 158 ± 84 mg NH₄⁺-N L⁻¹ d⁻¹ referida al compartimento aerobio. El sistema IFAS no pudo alcanzar la nitrificación completa del NO₂⁻ generado durante el período I, debido a la

acumulación de amoníaco libre en concentraciones de $1,1 \text{ mg NH}_3\text{-N L}^{-1}$, lo que supuso la inhibición de las bacterias oxidantes de nitrito (Anthonisen et al., 1976). Además, la velocidad de carga de nitrógeno total aplicada al sistema IFAS fue elevada, en torno a $135 \text{ mg N L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Después del día de operación 28, el NT medido en el compartimento anóxico fue de $2 \pm 2 \text{ mg L}^{-1}$, más alto que el observado en el efluente final.

Durante el período P2, se observa nitrificación de amonio a nitrato, el nitrito observado en el efluente final se mantuvo en valores inferiores a $0,2 \text{ mg NO}_2\text{-N L}^{-1}$, donde el sistema no pudo alcanzar tampoco la oxidación completa del amonio (Figura 3.4). La concentración de iones de nitrógeno en el efluente final fue de $22 \pm 7 \text{ mg NH}_4^+\text{-N L}^{-1}$ y $15 \pm 5 \text{ mg NO}_3^-\text{-N L}^{-1}$, con una velocidad de desnitrificación de $43 \pm 10 \text{ mg N L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, mientras que el NT alimentado se situó en valores de $54 \pm 8 \text{ mg L}^{-1}$. A pesar de la operación del sistema solo con biopelícula, la fracción de amonio que se oxidó lo hizo hasta la forma más oxidada, nitrato, alcanzando una velocidad de nitrificación de $202 \pm 60 \text{ mg NH}_4^+\text{-N L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. A pesar de que el valor de amoníaco libre se mantuvo elevado, el interior de la biopelícula se presenta como un ambiente más adecuado para el desarrollo de microorganismos nitrificantes en comparación con la biomasa floculenta, de cara a tolerar mejor este inhibidor (Villaverde et al., 2000). La concentración media de NT en el compartimento anóxico fue de $39 \pm 10 \text{ mg N L}^{-1}$, mientras que ese valor para en el efluente final fue $36 \pm 10 \text{ mg N L}^{-1}$, lo que pondría de manifiesto una potencial eliminación parcial de nitrógeno en la cámara aerobia de la etapa de postratamiento. La eliminación de NT disminuyó hasta el 33% como resultado de los mayores requerimientos de dadores de electrones para la desnitrificación con nitrato y a la menor velocidad de desnitrificación que se podría obtener con este ion.

El metano disuelto se eliminó de forma biológica en el sistema IFAS durante P1 en gran medida (85%), eliminándose por desorción el 15% restante. En torno a un 50% del metano disuelto se eliminó en el compartimento anóxico, y un 35% adicional en el compartimento aerobio. La eliminación biológica de metano disminuyó en el período P2 hasta el 69%, con un 37% y un 32% relativos al compartimento anóxico y aerobio, respectivamente. Es muy probable que esta bajada en la eliminación del metano disuelto esté relacionada con el lavado de la biomasa en suspensión de sistema. La eliminación de metano disuelto en el compartimento aerobio se estimó considerando el $k_L a$ del oxígeno y las concentraciones medidas de oxígeno y metano disuelto en el compartimento aerobio.

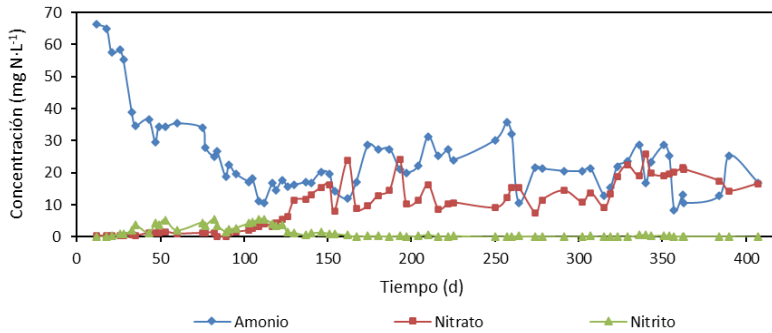


Figura 3.4. Evolución de las concentraciones de iones de nitrógeno (amonio, nitrito y nitrato) observadas en el efluente final del SIAL.

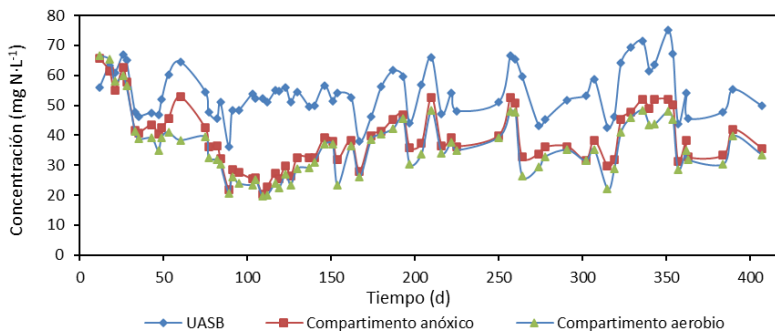


Figura 3.5. Comparativa de la concentración de NT a la salida del UASB y presentes en los compartimentos anóxico y aerobio del IFAS.

En la Ecuación 3.2 el $k_L a_{O_2}$ representa el coeficiente volumétrico de transferencia de masa para el oxígeno (d^{-1}); Velocidad de consumo de oxígeno, medida en el compartimento aerobio ($mg\ O_2\ L^{-1}\ d^{-1}$), y calculada a partir de las velocidades de eliminación observadas de amonio y nitrito; $OD_{saturación}$, representa la concentración de OD a la temperatura de operación ($mg\ O_2\ L^{-1}$); $OD_{aerobio}$, concentración medida en el compartimento aerobio ($mg\ O_2\ L^{-1}$).

$$k_L a_{O_2} = \frac{\text{Velocidad consumo de oxígeno}_{aerobio}}{(OD_{saturación} - OD_{aerobio})} \quad (\text{Ecuación 3.2})$$

Considerando la metodología de cálculo propuesta por Sánchez et al. (2016), la cantidad de metano desorbido en el compartimento aerobio se puede calcular

mediante la Ecuación 3.3, donde $CH_{4\text{desorbido}}$ representa cantidad de metano desorbido por unidad de volumen y tiempo ($\text{mg CH}_4 \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) y C_{CH_4} la concentración de metano disuelto medida ($\text{mg CH}_4 \text{ L}^{-1}$).

$$CH_{4\text{desorbido}} = C_{CH_4} \cdot 0.8 \cdot k_L a_{O_2} \quad (\text{Ecuación 3.3})$$

Empleando las ecuaciones anteriores, se obtienen unas velocidades de eliminación de metano medias de 53 ± 33 y $44 \pm 20 \text{ mg CH}_4 \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, a partir de las cuales se calculan las eliminaciones de metano disuelto estimadas en el compartimento aerobio mencionadas previamente.

3.3.3 Análisis microbiológicos

. Los análisis de FISH y los análisis metagenómicos, usando Illumina, permiten dilucidar cuales han sido los principales grupos tróficos y microorganismos que han intervenido en los procesos de eliminación de metano y nitrógeno.

Los resultados metagenómicos del análisis, vía Illumina, realizado en el día de operación 368 indicaron que en las biopelículas de Levapor y Biochip se encontraron 27 y 22 géneros diferentes de bacterias, respectivamente, con más del 1% de abundancia relativa.

Los análisis microbiológicos de la biomasa en suspensión y la biopelícula en el compartimento aerobio indicaron que, dentro de los microorganismos nitrificantes, solamente estaban presentes bacterias amonio oxidantes, con una baja presencia de nitrito oxidantes, durante P1, confirmando la nitrificación parcial de amonio a nitrito en este periodo. En P2 se observó el crecimiento de *Nitrospira* spp. siendo el presunto microorganismo responsable de la oxidación de nitrito a nitrato.

Los metanótrofos tipo I, microorganismos oxidantes de metano aerobios, fueron detectados mediante FISH en grandes cantidades en la biomasa en suspensión durante P1, y en los 2 tipos de biopelículas durante toda la operación. En el día de operación 368 (P2), el análisis mediante Illumina indicó que la abundancia relativa de los metanótrofos tipo I en partículas de soporte Levapor de la cámara anóxica y Biochip de la cámara aerobia fue del 2,10% y 6,15%, respectivamente. La presencia de bacterias n-damo fue muy baja, solo se detectó un 0,02% de dichos organismos en el compartimento anóxico. No se detectaron N-damo arqueas. Estos datos indican que

la eliminación biológica de metano disuelto fue llevada a cabo principalmente por metanótrofos tipo I y no por microorganismos n-damo. La disminución observada en la eliminación de metano disuelto en el período P2 estuvo asociada al lavado de la biomasa en suspensión. Además, la presencia de metanótrofos aerobios en la biopelícula aerobia, detectados tanto por FISH (Figura 3.6) como por Illumina, corrobora el hecho de que en el compartimento aerobio se produjera una eliminación biológica apreciable de metano disuelto en los dos períodos experimentales.

Tanto el ion amonio como el ion nitrito estaban disponibles en el licor de mezcla de la cámara aerobia, siendo la presencia de nitrito despreciable en la cámara anóxica. Ello, junto con ambientes anóxicos, facilitó que se cumpliesen las condiciones operacionales para el crecimiento de microorganismos anammox, especialmente en la cámara aerobia. Estos microorganismos fueron detectados mediante los análisis FISH en el día de operación 265 en las 2 biopelículas, anóxica y aerobia (Figura 3.6), con una abundancia relativa en el día de operación 368 de un 3,18% en la biopelícula del soporte Levapor, y con una abundancia del 6,33% en la biopelícula del soporte Biochip, según los resultados obtenidos mediante el análisis de Illumina (Figura 3.7). La eliminación de nitrógeno se llevó a cabo por desnitrificantes heterótrofos durante el período P1, pero, en el período P2, el proceso anammox contribuyó a la eliminación de nitrógeno, al desarrollarse, posiblemente, en la parte interna anóxica/anaerobia del soporte Biochip usado en la cámara aerobia. Ello podría explicar la menor concentración de NT observada en el efluente final con respecto a la observada en la cámara anóxica, que se encontró a lo largo de todo el período P2.

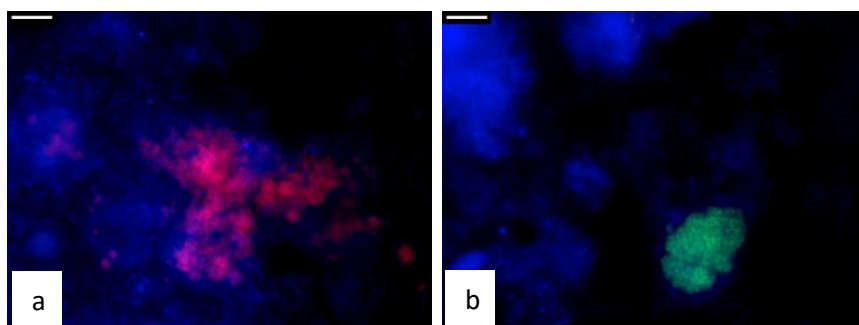


Figura 3.6. Presencia de (a) Anammox (rosa) y (b) Metanótrofos aerobios Tipo 1 (verde) en la biopelícula de Biochip en el compartimento aerobio en el día de operación 265. Todas las células se tiñeron con DAPI (blue). Las barras de escala indican 10 μm .

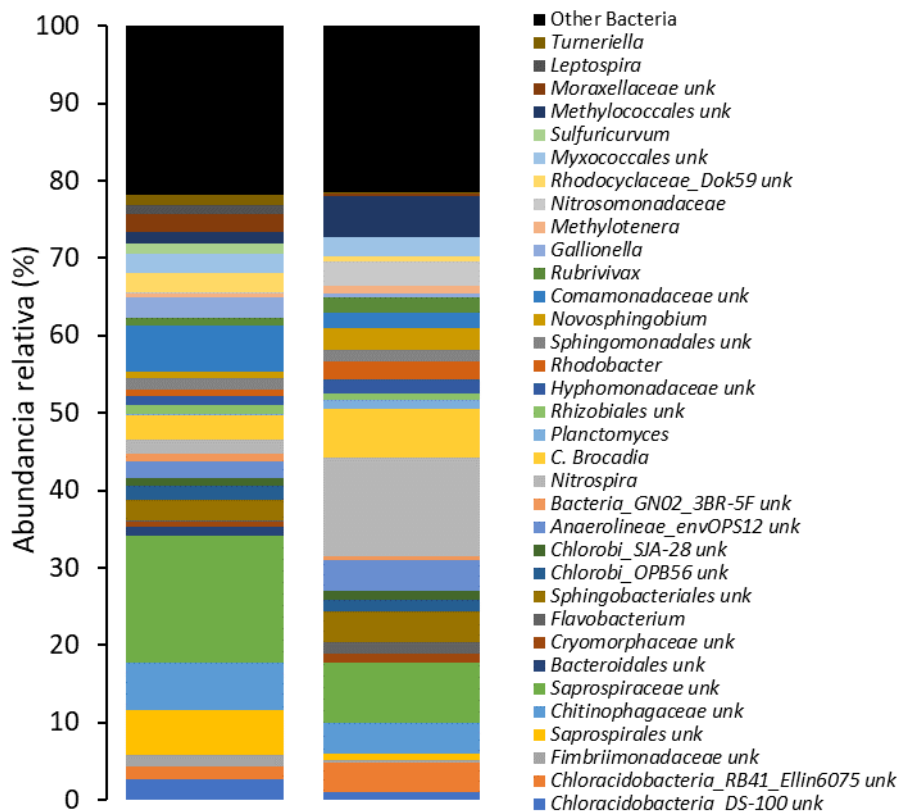


Figura 3.7. Resultados del análisis por Illumina de la clasificación por géneros para los soportes Levapor (izquierda) y Biochip (derecha) en el día de operación 368.

3.3.4 Eliminación de microcontaminantes orgánicos

Se estudió la eliminación de los microcontaminantes orgánicos seleccionados en conjunto del sistema híbrido, así como en cada etapa. La Figura 3.8 muestra las eficacias de eliminación obtenidas mediante balances de masa aplicados tanto al reactor UASB como al postratamiento IFAS. La sorción no fue significativa debido a que los microcontaminantes estudiados no son compuestos lipofílicos. A pesar de que algunos de los compuestos estudiados pueden estar presentes en el licor de mezcla en su forma de carga positiva (p.e. carbamazepina catiónica) e interaccionar electrostáticamente con las superficies con carga negativa de los microorganismos (fenómeno de adsorción) (Torresi et al., 2017), en este estudio no fue relevante de acuerdo con estudios previos sobre operación de reactores UASB a largo plazo

(Alvarino et al., 2016b, 2014). En consecuencia, la eliminación de microcontaminantes orgánicos se asoció con la biotransformación (Suárez et al., 2008), confirmando este hecho mediante cálculos de flujo másico. En el reactor anaerobio se eliminaron 4 compuestos de forma sustancial: los antibióticos SMX y TMP, el estrógeno estradiol y el antiinflamatorio NPX (con una eliminación mayor al 80%). Los microcontaminantes restantes presentaron eliminaciones bajas, alcanzando la siguiente etapa del tren de tratamiento, el sistema IFAS (Figura 3.8). Su biotransformación anaerobia se puede explicar en parte debido a su estructura química. Uno de los grupos funcionales del antibiótico TMP es un anillo de pirimidina sustituido que es biodegradable bajo condiciones anaerobias (Adrian and Suflita, 1994), mientras que la biotransformación del SMX está relacionada con la presencia del grupo sulfonilo, un grupo captador de electrones (Alvarino et al., 2014). El microcontaminante NPX puede ser biotransformado a su metabolito *o*-desmetilnaproxeno (Ghattas et al., 2017), siendo este último recalcitrante bajo condiciones anaerobias, aunque un postratamiento aerobio podría mejorar su biotransformación (Ghattas et al., 2017; Lahti and Oikari, 2011). No se han apreciado diferencias significativas durante toda la operación en términos de eliminación de microcontaminantes en el reactor UASB (Figura 3.8), dado que la diferenciación entre los periodos P1 y P2 afecta solamente al postratamiento. Estos resultados concuerdan con estudios previos llevados a cabo empleando reactores UASB para tratar aguas residuales urbanas de baja-media carga (Alvarino et al., 2016b; de Graaff et al., 2011; de Wilt et al., 2018).

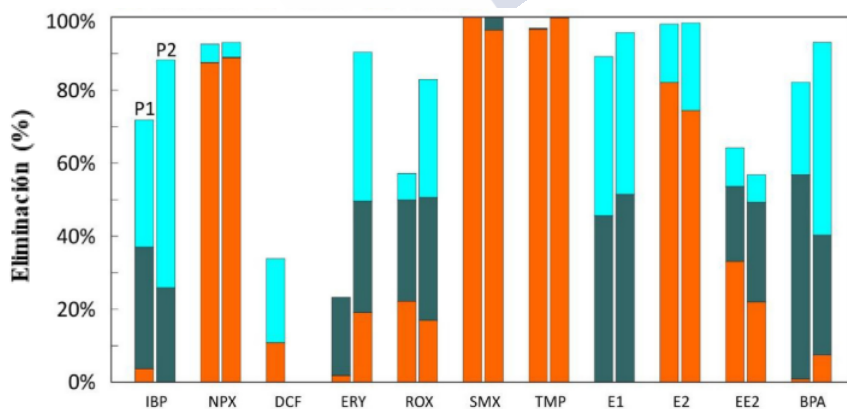


Figura 3.8. Eficiencias de eliminación de microcontaminantes orgánicos alcanzadas en las etapas anaerobia (▲), anóxica (▲) y aerobia (▲) en ambos periodos de operación, P1 y P2, a izquierda y derecha en cada compuesto, respectivamente.

Además de para la eliminación de DQO y nitrógeno, el postratamiento toma una consideración importante de cara a obtener eficiencias de eliminación mayores de la mayoría de los microcontaminantes orgánicos, y particularmente de aquellos que no se han visto afectados en el reactor UASB. Algunos compuestos como BPA, E1 e IBP fueron eliminados principalmente en la etapa de postratamiento, mientras que la eliminación de una serie de microcontaminantes se vio favorecida por la combinación de las 3 condiciones de potencial oxidación-reducción (ROX y EE2). Esto es una evidencia de como los sistemas híbridos, considerando ambientes con diferentes potenciales de oxidación-reducción, pueden mejorar las posibilidades de los reactores biológicos para optimizar la biotransformación de muchos de los compuestos presentes en la mezcla compleja de microcontaminantes orgánicos detectados en aguas residuales urbanas (Alvarino et al., 2018; de Wilt et al., 2018; Falås et al., 2016). Es más, aunque es común reportar eliminaciones mayores de microcontaminantes en ambientes aerobios respecto a condiciones anóxicas, Torresi et al. (2018) demostró que en ausencia de limitación de cometabolismo, la biotransformación de varios microcontaminantes puede ser más ventajosa bajo condiciones anóxicas que bajo condiciones aerobias.

La Figura 3.9 muestra las eficiencias de eliminación globales obtenidas para los microcontaminantes orgánicos considerando el proceso global UASB+IFAS para los periodos P1 y P2. Debido a que la operación del reactor UASB se mantuvo estable sin cambios operacionales, las diferencias entre los 2 periodos están relacionadas con los cambios observados en el postratamiento IFAS. Las diferencias operacionales más importantes que han podido influir en el comportamiento de los microcontaminantes fueron aquellas relacionadas con la nitrificación y las configuraciones de la biomasa: en P1 solamente tuvo lugar nitrificación parcial seguida de desnitrificación heterótrofa, así como la coexistencia de biomasa en suspensión y biopelícula; durante P2 se alcanzó la nitrificación completa y los procesos biológicos fueron impulsados solamente en la biopelícula. A pesar del lavado de la mayor parte de la biomasa en suspensión, las eficiencias de eliminación de microcontaminantes se mantuvieron a lo largo de P2. En el caso de algunos microcontaminantes, como ERY y, en menor medida ROX e IBP, las eficiencias de eliminación durante P2 llegaron incluso a ser mayores. Otros autores también observaron actividades mayores en sistemas de biopelícula, en comparación con biomasa en suspensión, en términos de eliminación de microcontaminantes (Falås et al., 2013), confirmando la importancia de la configuración física de la biomasa. Una de las razones que se indican es la mayor capacidad de la biopelícula para proteger los microorganismos de condiciones

adversas, como la presencia de inhibidores (Butler and Boltz, 2014; Ooi et al., 2017). Además, el mayor tiempo de retención celular de la biomasa adherida facilita el desarrollo de microorganismos de crecimiento lento, como los nitrificantes, promoviendo una mayor diversidad microbiana (De La Torre et al., 2015; Jiang et al., 2018). Este hecho fue observado en otros estudios, donde la eliminación de IBP y estrógenos naturales aumentó al incorporar soportes dentro del biorreactor en estudio, que estaba correlacionado con el incremento de la velocidad de nitrificación (Alvarino et al., 2016b).

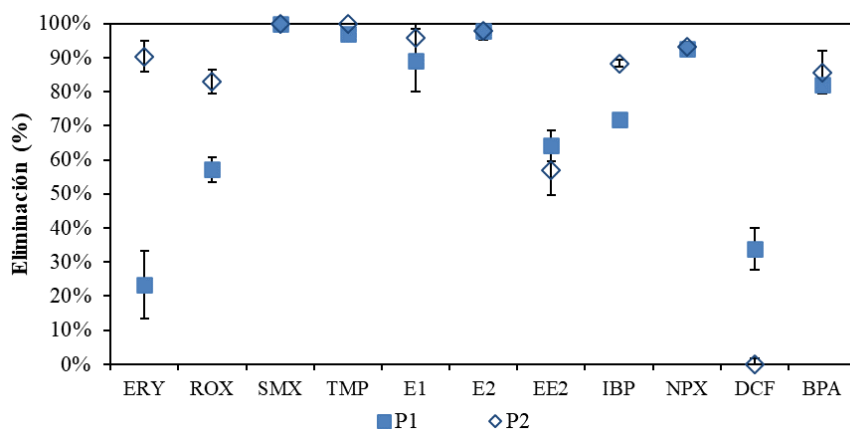


Figura 3.9. Comparación entre los 2 periodos de operación en términos de eliminación global de microcontaminantes orgánicos en el sistema.

En el caso de las hormonas naturales E1 y E2, se observaron eficiencias de eliminación superiores al 90% en ambos periodos de operación. La presencia de grupos funcionales dadores de electrones fuertes ($-OH$) en su estructura química explica su eliminación bajo condiciones aerobias (Grandclément et al., 2017). Este hecho fue especialmente relevante en el caso de E1, pues fue biotransformado por completo en las etapas anóxico y aerobia del postratamiento IFAS. Sin embargo, el compuesto E2 se eliminó principalmente en el reactor UASB (más de un 80%), mientras la fracción restante se degradó por completo en el postratamiento (Figura 3.8). Este comportamiento se ajusta a los resultados obtenidos por Joss et al. (2004) que, realizando una comparativa de la eliminación de E1 bajo condiciones aerobias y anóxicas, observó una velocidad de biotransformación mayor con potenciales de oxidación-reducción positivos. La eliminación de la fracción restante del compuesto E2 en los compartimentos anóxico y aerobio no se vio afectada por el cambio de

poblaciones microbianas observado, dado que en P2 se desarrollaron bacterias nitrato oxidantes y anammox. Este hecho está en concordancia con los resultados obtenidos por Peng et al. (2018), cuya conclusión fue que la biotransformación llevada a cabo por bacterias oxidantes de amonio es dominante respecto a la biotransformación llevada a cabo por otras bacterias.

La eliminación de la hormona sintética EE2 fue menor al 70% durante toda la operación (Figura 3.9). Se observó que las diferentes condiciones de potencial oxidación-reducción ejercieron una contribución positiva sobre la eliminación global de esta hormona. A diferencia del caso de las hormonas naturales, la eliminación de EE2 disminuyó levemente a lo largo de la operación, cuando la etapa de postratamiento funcionó como un sistema de biopelícula y la velocidad de desnitrificación disminuyó (P2). En efecto, se encontró una relación lineal entre la velocidad de desnitrificación y la eliminación de EE2, sugiriendo que su eliminación se lleva a cabo por cometabolismo, como reportó previamente Su et al. (2015). Observaron que la capacidad de eliminación de EE2 depende de la actividad de desnitrificación heterótrofa. Igualmente, las bacterias heterótrofas pueden contribuir a la eliminación de EE2, biotransformándolo a E1 en condiciones aerobias, como es el caso de *Spingobacterium* (Haiyan et al., 2007).

El antiinflamatorio IBP mostró un comportamiento recalcitrante bajo condiciones anaerobias, mientras que fue fácilmente biotransformado bajo condiciones aerobias (Figura 3.8). Estudios previos mostraron la influencia del proceso de nitrificación sobre la eliminación de IBP (Alvarino et al., 2016b; Tran et al., 2009). Ello es debido a la disponibilidad de carbones secundarios y terciarios en cadenas de alquilo lineales en su estructura química, para ser hidroxilados por amonio monooxigenasa, así como por acción de bacterias nitrato oxidantes (Fernandez-Fontaina et al., 2016). En el reactor, se observó una mejora en la biotransformación de IBP durante P2 (Figura 3.9), que puede ser debida a la presencia de bacterias nitrato oxidantes cuando la nitrificación total fue alcanzada. De hecho, Fernandez-Fontaina et al. (2016) determinaron velocidades de biotransformación de IBP mayores cuando la actividad de bacterias nitrato oxidantes era la predominante en el proceso de nitrificación. La contribución de otros microorganismos en la eliminación de IBP, como bacterias heterótrofas, tiene que ser considerada, a pesar de que influyen en menor medida en la biotransformación de IBP con respecto a las bacterias autótrofas (Fernandez-Fontaina et al., 2016; Tran et al., 2009).

La eliminación de los antibióticos ERY y ROX mejoró durante el segundo periodo de operación (Figura 3.9). De hecho, el compuesto ERY tuvo un comportamiento casi recalcitrante durante P1 (eliminación menor al 25%), mientras que en P2 fue eliminado casi por completo (más del 95%). El compuesto ROX también presentó un leve incremento en su eliminación a lo largo de P2. En este caso, el desarrollo de bacterias nitrato oxidantes, alcanzando la nitrificación total, y el crecimiento de bacterias anammox, podrían ser los factores que expliquen esas observaciones. Por ejemplo, Torresi et al. (2016) observaron una correlación positiva entre la velocidad de eliminación de ERY y la diversidad microbiana. Alvarino et al. (2016b) obtuvo una correlación directa entre la velocidad de degradación de amonio y la eliminación de estos dos antibióticos. Además, la influencia de la actividad anammox sobre la eliminación de ERY en reactores nitrificación-anammox también fue alcanzada (Alvarino et al., 2015).

Tal y como se muestra en la Figura 3.9, el DCF fue el único compuesto que mostró una eficiencia de eliminación mayor en P1 que en P2. La explicación de este hecho podría estar relacionada con la presencia de nitrato en el compartimento aerobio (Figura 3.10), dado que solamente se estaba produciendo nitrificación/desnitrificación parciales. De hecho, se observó una correlación entre la concentración de nitrato y la eliminación de DCF. Osorio et al. (2016) estudiaron la eliminación de DCF en el proceso de nitrificación/desnitrificación convencional, y detectaron los metabolitos nitroso-DCF y 5-nitro-DCF en presencia de nitrato.

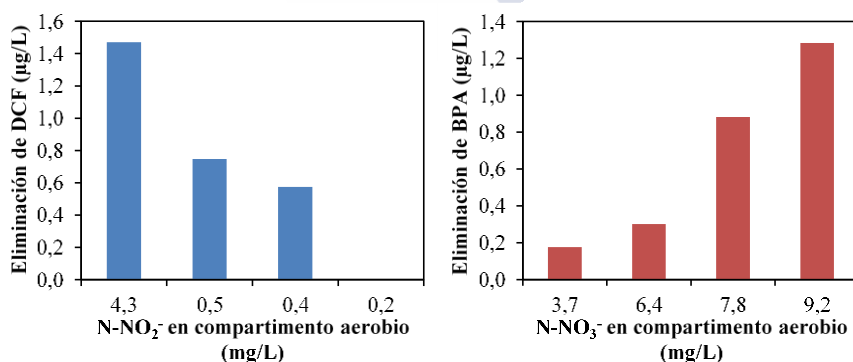


Figura 3.10. Influencia de la presencia de nitrato en el compartimento aerobio en la eliminación de DCF (izquierda), y de la oxidación de nitrato en la eliminación de BPA (derecha).

El comportamiento del disruptor endocrino BPA muestra que es un compuesto recalcitrante bajo condiciones anaerobias, pero se biotransforma fácilmente durante la etapa anóxica-aerobia durante P1 y P2 (Figuras 3.8 y 3.9). Su degradación puede relacionarse con la velocidad de desnitrificación en el sistema IFAS (Guerra et al., 2015; Yang et al., 2016). Se ha observado una correlación entre la eficiencia de eliminación de BPA y la concentración de nitrato en el compartimento aerobio (Figura 11), lo que evidencia el papel de las bacterias nitrato oxidantes en este proceso. A pesar de ello, las eficiencias de eliminación de BPA se mantuvieron constantes durante toda la operación (Figura 3.9), indicando que también otros microorganismos (por ejemplo bacterias heterótrofas) influyeron en su biotransformación (Zielińska et al., 2014).

3.4 CONCLUSIONES

En el contexto de desarrollo de procesos más sostenibles para el tratamiento de aguas residuales, los procesos basados en la digestión anaerobia son cada vez más atractivos. El proceso innovador SIAL propuesto en este trabajo, basado en la combinación de una etapa anaerobia (reactor UASB) y un sistema IFAS, es especialmente indicado para minimizar los problemas derivados de este enfoque, como emisiones de nitrógeno y metano, así como para alcanzar altas eficacias de eliminación de un amplio rango de microcontaminantes orgánicos.

En este sistema se lograron elevadas eliminaciones de DQO (93%) que coincide con la eficiencia de la primera etapa UASB, mientras que el nitrógeno fue eliminado por un consorcio de desnitrificantes heterótrofos, oxidación de metano, y microorganismos anammox. Los metanótrofos presentes en la biomasa en suspensión y en biopelícula en los compartimentos anóxico y aerobio fueron los responsables de una reducción de metano disuelto de hasta un 85%.

La etapa anaerobia potenció la eliminación de varios microcontaminantes orgánicos, como los antibióticos TMP y SMX con respecto a procesos convencionales anóxico-aerobios. La combinación de diferentes configuraciones de biomasa mejoró la microbiología del reactor, principalmente bajo condiciones anóxicas. El crecimiento de bacterias anammox en la biopelícula tuvo una influencia positiva sobre la eliminación del antibiótico ERY. Se observó una correlación entre la presencia de nitrato en el compartimento aerobio y la eliminación de DCF, mientras que la eliminación de BPA fue ligeramente dependiente de la oxidación de nitrato. El lavado

de biomasa no tuvo un impacto significativo en la eliminación de microcontaminantes orgánicos, lo que demuestra el papel decisivo que tiene la biopelícula, aunque los metanótrofos se vieron afectados negativamente. El desarrollo y sostenimiento de biomasa con alto contenido en organismos metanótrofos se presenta como una herramienta para optimizar el sistema en términos de reducción de emisiones de metano y nitrógeno. El experimento realizado muestra resultados positivos en cuanto a eliminación de microcontaminantes, llegando a eliminar casi en su totalidad varios de ellos; sin embargo, se necesitaría de una etapa posterior para eliminar por completo la fracción remanente de algunos microcontaminantes que el sistema no es capaz de eliminar de forma biológica.

3.5 BIBLIOGRAFÍA

- Adrian, N.R., Suflita, J.M., 1994. Anaerobic biodegradation of halogenated and nonhalogenated N-, s-, and o-heterocyclic compounds in aquifer slurries. *Environ. Toxicol. Chem.* 13, 1551–1557.
<https://doi.org/10.1002/etc.5620131002>
- Allegue, T., Carballo-Costa, M.N., Fernandez-Gonzalez, N., Garrido, J.M., 2020. Simultaneous nitrogen and dissolved methane removal from an upflow anaerobic sludge blanket reactor effluent using an integrated fixed-film activated sludge system. *J. Environ. Manage.* 263, 110395.
<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.110395>
- Altmann, J., Ruhl, A.S., Zietzschmann, F., Jekel, M., 2014. Direct comparison of ozonation and adsorption onto powdered activated carbon for micropollutant removal in advanced wastewater treatment. *Water Res.* 55, 185–193.
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.02.025>
- Alvarino, T., Allegue, T., Fernandez-Gonzalez, N., Suarez, S., Lema, J.M., Garrido, J.M., Omil, F., 2019. Minimization of dissolved methane, nitrogen and organic micropollutants emissions of effluents from a methanogenic reactor by using a preanoxic MBR post-treatment system. *Sci. Total Environ.* 671, 165–174.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.169>
- Alvarino, T., Komesli, O., Suarez, S., Lema, J.M., Omil, F., 2016a. The potential of the innovative SeMPAC process for enhancing the removal of recalcitrant organic micropollutants. *J. Hazard. Mater.* 308, 29–36.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.01.040>
- Alvarino, T., Suárez, S., Garrido, M., Lema, J.M., Omil, F., 2016b. A UASB reactor

- coupled to a hybrid aerobic MBR as innovative plant configuration to enhance the removal of organic micropollutants. *Chemosphere* 144, 452–458. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.09.016>
- Alvarino, T., Suarez, S., Katsou, E., Vazquez-Padin, J., Lema, J.M., Omil, F., 2015. Removal of PPCPs from the sludge supernatant in a one stage nitrification/anammox process. *Water Res.* 68, 701–709. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.10.055>
- Alvarino, T., Suarez, S., Lema, J., Omil, F., 2018. Understanding the sorption and biotransformation of organic micropollutants in innovative biological wastewater treatment technologies. *Sci. Total Environ.* 615, 297–306. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2017.09.278>
- Alvarino, T., Suarez, S., Lema, J.M., Omil, F., 2014. Understanding the removal mechanisms of PPCPs and the influence of main technological parameters in anaerobic UASB and aerobic CAS reactors. *J. Hazard. Mater.* 278, 506–513. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.06.031>
- Anthonisen, A.C., Loehr, R.C., Prakasam, T.B.S., Srinath, E.G., 1976. Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid. *J. Water Pollut. Control Fed.* 48, 835–852. [https://doi.org/10.1016/0168-6496\(92\)90072-2](https://doi.org/10.1016/0168-6496(92)90072-2)
- Beijer, K., Björlenius, B., Shaik, S., Lindberg, R.H., Brunström, B., Brandt, I., 2017. Removal of pharmaceuticals and unspecified contaminants in sewage treatment effluents by activated carbon filtration and ozonation: Evaluation using biomarker responses and chemical analysis. *Chemosphere* 176, 342–351. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.02.127>
- Butler, C.S., Boltz, J.P., 2014. Biofilm Processes and Control in Water and Wastewater Treatment, in: *Comprehensive Water Quality and Purification*. Elsevier Inc., pp. 90–107. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382182-9.00083-9>
- Cakir, F.Y., Stenstrom, M.K., 2005. Greenhouse gas production: A comparison between aerobic and anaerobic wastewater treatment technology. *Water Res.* 39, 4197–4203. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2005.07.042>
- Cavalcanti, P.F.F., Van Haandel, A., Lettinga, G., 2001. Polishing ponds for post-treatment of digested sewage part 1: Flow-through ponds, in: *Water Science and Technology*. IWA Publishing, pp. 237–245. <https://doi.org/10.2166/wst.2001.0229>

- Chen, X., Guo, J., Xie, G.-J., Yuan, Z., Ni, B.-J., 2016. Achieving complete nitrogen removal by coupling nitrification-anammox and methane-dependent denitrification: A model-based study. *Biotechnol. Bioeng.* 113, 1035–45. <https://doi.org/10.1002/bit.25866>
- Chernicharo, C.A.L., Machado, R.M.G., 1998. Feasibility of the UASB/AF system for domestic sewage treatment in developing countries, in: *Water Science and Technology*. No longer published by Elsevier, pp. 325–332. [https://doi.org/10.1016/S0273-1223\(98\)00708-2](https://doi.org/10.1016/S0273-1223(98)00708-2)
- Chernicharo, C.A.L., van Lier, J.B., Noyola, A., Bressani Ribeiro, T., 2015. Anaerobic sewage treatment: state of the art, constraints and challenges. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* <https://doi.org/10.1007/s11157-015-9377-3>
- Clara, M., Kreuzinger, N., Strenn, B., Gans, O., Kroiss, H., 2005. The solids retention time - A suitable design parameter to evaluate the capacity of wastewater treatment plants to remove micropollutants. *Water Res.* 39, 97–106. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2004.08.036>
- De Gisi, S., Lofrano, G., Grassi, M., Notarnicola, M., 2016. Characteristics and adsorption capacities of low-cost sorbents for wastewater treatment: A review. *Sustain. Mater. Technol.* <https://doi.org/10.1016/j.susmat.2016.06.002>
- de Graaff, M.S., Vieno, N.M., Kujawa-Roeleveld, K., Zeeman, G., Temmink, H., Buisman, C.J.N., 2011. Fate of hormones and pharmaceuticals during combined anaerobic treatment and nitrogen removal by partial nitrification-anammox in vacuum collected black water. *Water Res.* 45, 375–383. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.08.023>
- De La Torre, T., Alonso, E., Santos, J.L., Rodríguez, C., Gómez, M.A., Malfeito, J.J., 2015. Trace organics removal using three membrane bioreactor configurations: MBR, IFAS-MBR and MBMBR. *Water Sci. Technol.* 71, 761–768. <https://doi.org/10.2166/wst.2015.028>
- de Wilt, A., He, Y., Sutton, N., Langenhoff, A., Rijnaarts, H., 2018. Sorption and biodegradation of six pharmaceutically active compounds under four different redox conditions. *Chemosphere* 193, 811–819. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.11.084>
- Di Trapani, D., Di Bella, G., Mannina, G., Torregrossa, M., Viviani, G., 2014. Comparison between moving bed-membrane bioreactor (MB-MBR) and membrane bioreactor (MBR) systems: Influence of wastewater salinity variation. *Bioresour. Technol.* 162, 60–69. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.03.126>

- Dubey, M., Mohapatra, S., Tyagi, V.K., Suthar, S., Kazmi, A.A., 2021. Occurrence, fate, and persistence of emerging micropollutants in sewage sludge treatment. *Environ. Pollut.* 273, 116515. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.116515>
- Escolà Casas, M., Chhetri, R.K., Ooi, G., Hansen, K.M.S., Litty, K., Christensson, M., Kragelund, C., Andersen, H.R., Bester, K., 2015. Biodegradation of pharmaceuticals in hospital wastewater by a hybrid biofilm and activated sludge system (Hybas). *Sci. Total Environ.* 530–531, 383–392. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2015.05.099>
- Ettwig, K.F., Butler, M.K., Le Paslier, D., Pelletier, E., Mangenot, S., Kuypers, M.M.M., Schreiber, F., Dutilh, B.E., Zedelius, J., de Beer, D., Gloerich, J., Wessels, H.J.C.T., van Alen, T., Luesken, F., Wu, M.L., van de Pas-Schoonen, K.T., Op den Camp, H.J.M., Janssen-Megens, E.M., Francoijs, K.-J., Stunnenberg, H., Weissenbach, J., Jetten, M.S.M., Strous, M., 2010. Nitrite-driven anaerobic methane oxidation by oxygenic bacteria. *Nature* 464, 543–8. <https://doi.org/10.1038/nature08883>
- Falås, P., Baillon-Dhumez, A., Andersen, H.R., Ledin, A., La Cour Jansen, J., 2012. Suspended biofilm carrier and activated sludge removal of acidic pharmaceuticals. *Water Res.* 46, 1167–1175. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.12.003>
- Falås, P., Longrée, P., La Cour Jansen, J., Siegrist, H., Hollender, J., Joss, A., 2013. Micropollutant removal by attached and suspended growth in a hybrid biofilm-activated sludge process. *Water Res.* <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.05.010>
- Falås, P., Wick, A., Castronovo, S., Habermacher, J., Ternes, T.A., Joss, A., 2016. Tracing the limits of organic micropollutant removal in biological wastewater treatment. *Water Res.* 95, 240–249. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.03.009>
- Feng, Y., Peng, Y., Wang, B., Liu, B., Li, X., 2021. A continuous plug-flow anaerobic/aerobic/anoxic/aerobic (AOAO) process treating low COD/TIN domestic sewage: realization of partial nitrification and extremely advanced nitrogen removal. *Sci. Total Environ.* 771, 145387. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145387>
- Fernandez-Fontaina, E., Gomes, I.B., Aga, D.S., Omil, F., Lema, J.M., Carballa, M., 2016. Biotransformation of pharmaceuticals under nitrification, nitrataion and heterotrophic conditions. *Sci. Total Environ.* 541, 1439–1447. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.10.010>

- Fernández, Manuel, Fernández, Mónica, Laca, Amanda, Laca, Adriana, Díaz, M., 2014. Seasonal occurrence and removal of pharmaceutical products in municipal wastewaters. *J. Environ. Chem. Eng.* 2, 495–502.
<https://doi.org/10.1016/j.jece.2014.01.023>
- Ge, H., Batstone, D.J., Mouiche, M., Hu, S., Keller, J., 2017. Nutrient removal and energy recovery from high-rate activated sludge processes – Impact of sludge age. *Bioresour. Technol.* 245, 1155–1161.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.08.115>
- Ghattas, A.K., Fischer, F., Wick, A., Ternes, T.A., 2017. Anaerobic biodegradation of (emerging) organic contaminants in the aquatic environment. *Water Res.*
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.02.001>
- Grandclément, C., Seyssiecq, I., Piram, A., Wong-Wah-Chung, P., Vanot, G., Tiliacos, N., Roche, N., Doumenq, P., 2017. From the conventional biological wastewater treatment to hybrid processes, the evaluation of organic micropollutant removal: A review. *Water Res.*
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.01.005>
- Guerra, P., Kim, M., Teslic, S., Alaei, M., Smyth, S.A., 2015. Bisphenol-A removal in various wastewater treatment processes: Operational conditions, mass balance, and optimization. *J. Environ. Manage.* 152, 192–200.
<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2015.01.044>
- Haiyan, R., Shulan, J., ud din Ahmad, N., Dao, W., Chengwu, C., 2007. Degradation characteristics and metabolic pathway of 17 α -ethynylestradiol by *Sphingobacterium* sp. JCR5. *Chemosphere* 66, 340–346.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.04.064>
- Jia, Y., Khanal, S.K., Yin, L., Sun, L., Lu, H., 2021. Influence of ibuprofen and its biotransformation products on different biological sludge systems and ecosystem. *Environ. Int.* 146, 106265.
<https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.106265>
- Jiang, Q., Ngo, H.H., Nghiem, L.D., Hai, F.I., Price, W.E., Zhang, J., Liang, S., Deng, L., Guo, W., 2018. Effect of hydraulic retention time on the performance of a hybrid moving bed biofilm reactor-membrane bioreactor system for micropollutants removal from municipal wastewater. *Bioresour. Technol.* 247, 1228–1232. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.114>
- Jimenez, J., Miller, M., Bott, C., Murthy, S., De Clippeleir, H., Wett, B., 2015. High-rate activated sludge system for carbon management - Evaluation of crucial process mechanisms and design parameters. *Water Res.* 87, 476–482.

<https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.07.032>

- Joss, A., Andersen, H., Ternes, T., Richle, P.R., Siegrist, H., 2004. Removal of estrogens in municipal wastewater treatment under aerobic and anaerobic conditions: Consequences for plant optimization. *Environ. Sci. Technol.* 38, 3047–3055. <https://doi.org/10.1021/es0351488>
- Lahti, M., Oikari, A., 2011. Microbial transformation of pharmaceuticals naproxen, bisoprolol, and diclofenac in aerobic and anaerobic environments. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 61, 202–210. <https://doi.org/10.1007/s00244-010-9622-2>
- Liu, H.Q., Lam, J.C.W., Li, W.W., Yu, H.Q., Lam, P.K.S., 2017. Spatial distribution and removal performance of pharmaceuticals in municipal wastewater treatment plants in China. *Sci. Total Environ.* 586, 1162–1169. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.02.107>
- Nielsen, U., Hastrup, C., Klausen, M.M., Pedersen, B.M., Kristensen, G.H., Jansen, J.L.C., Bak, S.N., Tuerk, J., 2013. Removal of APIs and bacteria from hospital wastewater by MBR plus O₃, O₃ + H₂O₂, PAC or ClO₂. *Water Sci. Technol.* 67, 854–862. <https://doi.org/10.2166/wst.2012.645>
- Noyola, A., Morgan-Sagastume, J.M., López-Hernández, J.E., 2006. Treatment of biogas produced in anaerobic reactors for domestic wastewater: Odor control and energy/resource recovery. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 5, 93–114. <https://doi.org/10.1007/s11157-005-2754-6>
- Ooi, G.T.H., Tang, K., Chhetri, R.K., Kaarsholm, K.M.S., Sundmark, K., Kragelund, C., Litty, K., Christensen, A., Lindholm, S., Sund, C., Christensson, M., Bester, K., Andersen, H.R., 2017. Biodegradation of pharmaceuticals in a pilot-scale staged moving bed biofilm reactors (MBBRs). 15th International Conference on Environmental Science and Technology, Rhodes, Greece.
- Osorio, V., Sanchís, J., Abad, J.L., Ginebreda, A., Farré, M., Pérez, S., Barceló, D., 2016. Investigating the formation and toxicity of nitrogen transformation products of diclofenac and sulfamethoxazole in wastewater treatment plants. *J. Hazard. Mater.* 309, 157–164. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.02.013>
- Peng, L., Dai, X., Liu, Y., Sun, J., Song, S., Ni, B.J., 2018. Model-based assessment of estrogen removal by nitrifying activated sludge. *Chemosphere* 197, 430–437. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.01.035>

- Reif, R., Besancon, A., Le Corre, K., Jefferson, B., Lema, J.M., Omil, F., 2011. Comparison of PPCPs removal on a parallel-operated MBR and AS system and evaluation of effluent post-treatment on vertical flow reed beds. *Water Sci. Technol.* 63, 2411–2417. <https://doi.org/10.2166/wst.2011.123>
- Sánchez, A., Rodríguez-Hernández, L., Buntner, D., Esteban-García, A.L., Tejero, I., Garrido, J.M., 2016. Denitrification coupled with methane oxidation in a membrane bioreactor after methanogenic pre-treatment of wastewater. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 91, 2950–2958. <https://doi.org/10.1002/jctb.4913>
- Silva-Teira, A., Sánchez, A., Buntner, D., Rodríguez-Hernández, L., Garrido, J.M., 2017. Removal of dissolved methane and nitrogen from anaerobically treated effluents at low temperature by MBR post-treatment. *Chem. Eng. J.* <https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.06.047>
- Silva-Teira, A., Vázquez-Padín, J.R., Reif, R., Arias, A., Rogalla, F., Garrido, J.M., 2020. Assessment of a combined UASB and MBR process for treating wastewater from a seafood factory at different temperatures. *Desalin. Water Treat.* 180, 43–54. <https://doi.org/10.5004/dwt.2020.25076>
- Souza, C.L., Chernicharo, C.A.L., Aquino, S.F., 2011. Quantification of dissolved methane in UASB reactors treating domestic wastewater under different operating conditions. *Water Sci. Technol.* 64, 2259–2264. <https://doi.org/10.2166/wst.2011.695>
- Su, L., Aga, D., Chandran, K., Khunjar, W.O., 2015. Factors impacting biotransformation kinetics of trace organic compounds in lab-scale activated sludge systems performing nitrification and denitrification. *J. Hazard. Mater.* <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.08.007>
- Suárez, S., Carballa, M., Omil, F., Lema, J.M., 2008. How are pharmaceutical and personal care products (PPCPs) removed from urban wastewaters? *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* <https://doi.org/10.1007/s11157-008-9130-2>
- Sumino, H., Takahashi, M., Yamaguchi, T., Abe, K., Araki, N., Yamazaki, S., Shimozaki, S., Nagano, A., Nishio, N., 2007. Feasibility study of a pilot-scale sewage treatment system combining an up-flow anaerobic sludge blanket (UASB) and an aerated fixed bed (AFB) reactor at ambient temperature. *Bioresour. Technol.* 98, 177–182. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.10.020>
- Torresi, E., Fowler, S.J., Polesel, F., Bester, K., Andersen, H.R., Smets, B.F., Plósz, B.G., Christensson, M., 2016. Biofilm thickness influences biodiversity in nitrifying MBBRs - Implications on micropollutant removal. *Environ. Sci.*

Technol. 50, 9279–9288. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b02007>

- Torresi, E., Gülay, A., Polesel, F., Jensen, M.M., Christensson, M., Smets, B.F., Plósz, B.G., 2018. Reactor staging influences microbial community composition and diversity of denitrifying MBBRs- Implications on pharmaceutical removal. *Water Res.* <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.03.014>
- Torresi, E., Polesel, F., Bester, K., Christensson, M., Smets, B.F., Trapp, S., Andersen, H.R., Plósz, B.G., 2017. Diffusion and sorption of organic micropollutants in biofilms with varying thicknesses. *Water Res.* 123, 388–400. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.06.027>
- Tran, N.H., Reinhard, M., Gin, K.Y.-H., 2018. Occurrence and fate of emerging contaminants in municipal wastewater treatment plants from different geographical regions-a review. *Water Res.* 133, 182–207. <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2017.12.029>
- Tran, N.H., Urase, T., Kusakabe, O., 2009. The characteristics of enriched nitrifier culture in the degradation of selected pharmaceutically active compounds. *J. Hazard. Mater.* 171, 1051–1057. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.06.114>
- Villaverde, S., Fdz-Polanco, F., García, P.A., 2000. Nitrifying biofilm acclimation to free ammonia in submerged biofilters. Start-up influence. *Water Res.* 34, 602–610. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(99\)00175-X](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(99)00175-X)
- Von Sperling, M., Freire, V.H., De Lemos Chernicharo, C.A., 2001. Performance evaluation of a UASB-activated sludge system treating municipal wastewater, in: *Water Science and Technology*. IWA Publishing, pp. 323–328. <https://doi.org/10.2166/wst.2001.0698>
- Wang, D., Tao, J., Fan, F., Xu, R., Meng, F., 2021. A novel pilot-scale IFAS-MBR system with low aeration for municipal wastewater treatment: Linkages between nutrient removal and core functional microbiota. *Sci. Total Environ.* 145858. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145858>
- Wang, L., Li, B., Li, Y., Wang, J., 2021. Enhanced biological nitrogen removal under low dissolved oxygen in an anaerobic-anoxic-oxic system: Kinetics, stoichiometry and microbial community. *Chemosphere* 263, 128184. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128184>
- Yang, S., Hai, F.I., Price, W.E., McDonald, J., Khan, S.J., Nghiem, L.D., 2016.

Occurrence of trace organic contaminants in wastewater sludge and their removals by anaerobic digestion. *Bioresour. Technol.* 210, 153–159. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.12.080>

Zhu, J., Wang, Q., Yuan, M., Tan, G.-Y.A., Sun, F., Wang, C., Wu, W., Lee, P.-H., 2016. Microbiology and potential applications of aerobic methane oxidation coupled to denitrification (AME-D) process: A review. *Water Res.* 90, 203–215. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.12.020>

Zielińska, M., Cydzik-Kwiatkowska, A., Bernat, K., Bułkowska, K., Wojnowska-Baryła, I., 2014. Removal of bisphenol A (BPA) in a nitrifying system with immobilized biomass. *Bioresour. Technol.* 171, 305–313. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.08.087>



CAPÍTULO 4

IMPACTO DE LOS IONES DE AZUFRE EN LA EFICACIA DE ELIMINACIÓN DE METANO DISUELTO, NITRÓGENO TOTAL Y MICROCONTAMINANTES MEDIANTE LA TECNOLOGÍA SIAM

Resumen

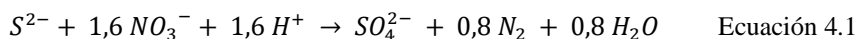
La tecnología SIAM (Sistema Integrado de biorreactor Anaerobio metanogénico y biorreactor de Membranas) ha sido desarrollada para superar los principales inconvenientes del tratamiento anaeróbico de aguas residuales a temperatura ambiente, altas emisiones de gases de efecto invernadero y baja eliminación de nitrógeno, donde se utiliza metano disuelto presente en el efluente de la etapa anaeróbica, como fuente de carbono para la desnitrificación en el postratamiento mediante MBR híbrido, con biomasa en suspensión y adherida. En este capítulo se ha investigado el impacto que puede tener la presencia del ion sulfato, que se encuentra presente en diversas aguas residuales urbanas e industriales, en la eficacia del sistema integrado. El ion sulfato, tras el tratamiento anaerobio en la etapa UASB se reduce a ion sulfuro que puede afectar al proceso de postratamiento en la etapa MBR. Se operó un prototipo con aguas residuales sintéticas que contenían una DQO de 1200 mg O₂ L⁻¹, 80 mg NT L⁻¹ y 50 mg SO₄²⁻-S L⁻¹, obteniendo una eliminación de DQO, respectivamente, del 80% y 96% en las etapas UASB y MBR. Se eliminó hasta un 84% de NT, utilizando la DQO residual, el sulfuro y el metano disuelto contenido en el efluente UASB como donantes de electrones para la desnitrificación. Además, la combinación de las condiciones redox diferentes en el sistema SIAM ha permitido el eliminar una amplia gama de OMP (fármacos y hormonas) sin que el sulfuro haya ejercido aparentemente ninguna acción positiva o negativa en dicha eliminación.

4.1 INTRODUCCIÓN	93
4.2 OPERACIÓN Y CONFIGURACIÓN DEL REACTOR	96
4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	98
4.3.1 Resultados generales.....	98
4.3.2 Eliminación de metano disuelto	100
4.3.3 Impacto del sulfuro de hidrógeno en la eliminación de nitrógeno.....	102
4.3.4 Eliminación de microcontaminantes	109
4.3.5 Microbiología.....	111
4.4 CONCLUSIONES	114
4.5 BIBLIOGRAFÍA	115

4.1 INTRODUCCIÓN

De cara a reducir los impactos ambientales que pueden derivar del uso de tratamientos anaerobios a temperatura ambiente para aguas residuales de baja carga, es necesario el uso de postratamientos para asegurar el cumplimiento de los parámetros de vertido en cuando a materia orgánica y nitrógeno, pero también para reducir las emisiones de GEI asociadas al metano que puede estar disuelto en el efluente de estos tratamientos. Dicho metano disuelto podría ser utilizado para desnitrificar en una etapa de postratamiento, mediante microorganismos metanótrofos aerobios o anaerobios para eliminar parte del metano disuelto y nitrógeno total (Sánchez et al. 2016). Con ello se evitaría la adición de una fuente de carbono externa en la etapa de postratamiento en aquellos casos donde la relación DQO/N sea baja, situación en la que el proceso de desnitrificación suele estar limitado por la materia orgánica. La adición de un dador de electrones externo derivaría en un aumento de los costes operativos de aquellas regiones cálidas del planeta, que optaron por tecnologías anaerobias metanogénicas UASB para tratar sus aguas y que ahora se planteen el eliminar NT, resultando de gran interés procesos de desnitrificación autótrofa para eliminar el nitrógeno.

Los tratamientos anaerobios no solo producen metano como dados de electrones, si no también sulfuro de hidrógeno (H_2S) cuando tratan aguas residuales con presencia de ion sulfato. El H_2S se produce por la reducción de sulfato mediante bacterias sulfato reductoras, empleando materia orgánica como dadora de electrones. Esta sustancia química lleva asociadas connotaciones ambientales negativas debido a su pestilencia y riesgo para la salud, la corrosión de los equipos o su efecto inhibitorio de diversos procesos biológicos. Este efecto inhibitorio podría suponer impedimentos significativos sobre la actividad de ciertos microorganismos en los sistemas de postratamiento de efluentes anaerobios, ya que el ion sulfuro puede causar el 50% de inhibición de la actividad de microorganismos oxidantes de amonio y nitrito en biomasa suspendida, a concentraciones de tan solo 2,6 y 1,2 mg S L⁻¹, respectivamente (Bejarano-Ortiz et al., 2015). Por otro lado, el ion sulfuro presente en efluentes de sistemas anaerobios puede potenciar la desnitrificación de nitrato en condiciones anóxicas, por oxidación de este ion a ion sulfato mediante bacterias autótrofas sulfuro oxidantes. La estequiometría de desnitrificación de sulfuro empleando nitrato como aceptor de electrones se muestra en la Ecuación 4.1 (Cardoso et al., 2006):



Una opción para reducir, mediante procesos biológicos, el impacto ambiental de tratamientos anaerobios sería la implementación etapas de postratamiento anóxicas y aerobias para la eliminación tanto de nitrógeno como de metano disuelto. En este sentido, el proceso SIAM se presenta como una alternativa para superar los inconvenientes de los tratamientos anaerobios. Este proceso, desarrollado en la “Universidade de Santiago de Compostela” (patente española ES2401445B2 y en EE.UU. US9725345B2) combina un reactor de manto de lodos de flujo ascendente UASB con un postratamiento de biorreactor híbrido de membrana (MBR). El MBR híbrido es esencialmente un proceso pre-anóxico compuesto por un compartimento anóxico y otro aerobio acoplados en serie, con biomasa suspensión y adherida en biopelículas en sendos compartimentos y un compartimento de filtración en el que disponen membranas de ultrafiltración. En el compartimento anóxico se produciría la desnitrificación y la oxidación del metano disuelto, mientras que en los compartimentos aerobio y de membrana se nitrificaría el ion amonio, generando aniones de nitrógeno. La membrana de ultrafiltración permite separar la biomasa en suspensión del agua tratada (Sánchez et al., 2016). En investigaciones previas se demostró que la presencia de potenciales de oxidación-reducción típicos de los ambientes anaerobio, anóxico y aerobio en la tecnología SIAM, fomenta la eliminación de microcontaminantes orgánicos (Alvarino et al., 2018) que, aunque aún no se encuentran regulada su eliminación en nuestro país, repercuten en una preocupación creciente en la sociedad por sus potenciales impactos en el ambiente (Sousa et al., 2018). Por otro lado la presencia de una membrana facilita la obtención de un efluente de alta calidad en términos de sólidos suspendidos e indicadores microbianos, facilitando la potencial reutilización del agua depurada (Hosseinzadeh et al., 2013).

El proceso SIAM ha sido objeto de varias investigaciones de cara a su optimización, para la eliminación de metano disuelto y nitrógeno. Silva-Teira et al. (2017) obtuvo unas eliminaciones de metano disuelto en el postratamiento del 80% y de nitrógeno de 10-15 mg L⁻¹, empleando nitrato como aceptor de electrones. Considerando la DQO eliminada en el postratamiento, estimó que el 27% del nitrógeno eliminado tuvo lugar mediante proceso de desnitrificación heterótrofa convencional. En una siguiente investigación, empleando tanto nitrito como nitrato como aceptor de electrones (Alvarino et al., 2019) se comprobó que la adición externa de nitrito mejoró las eliminaciones de nitrógeno total hasta el valor de 35 mg L⁻¹, manteniendo las eliminaciones de metano disuelto en torno a un 80%.

Uno de los problemas que se podrían presentar tanto para la tecnología SIAM como para otras tecnologías de postratamiento, es la posible presencia de iones de azufre en las aguas residuales. En aquellos sistemas anaerobios que traten aguas residuales que contengan sulfato, este ion se reduce a sulfuro, un conocido inhibidor de diversos procesos biológicos que también podría ser empleado como dador de electrones para la desnitrificación, en una etapa de postratamiento (Huiliñir et al., 2020). En prácticamente todas las aguas residuales brutas el azufre se presenta en forma de ion sulfuro o sulfato. La presencia de iones de azufre en las aguas residuales puede tener tanto un origen natural como antropogénico, ya sea por intrusión de agua de mar en la red de alcantarillado en zonas costeras o por contacto de las aguas continentales usadas como fuente de agua potable, con minerales de azufre presentes en el terreno. A modo de ejemplo la media de la concentración de ion sulfato, para agua de abastecimiento en España, es de $12,3 \text{ mg L}^{-1}$ llegando en alcanzar en diversas aguas residuales rangos comprendidos entre 45 y 165 mg L^{-1} , tal como se ha determinado para la región de Murcia durante el proyecto Life Siamec, en el que participó nuestro grupo de investigación (LIFE14 SIAMEC project; www.life-siamec.eu).

El objetivo del presente estudio fue evaluar el rendimiento del novedoso proceso SIAM sobre las eficacias de eliminación de metano disuelto, nitrógeno total y microcontaminantes orgánicos, tanto en ausencia como en presencia de ion sulfato en la alimentación y ver su potencial efecto sobre las comunidades microbianas en la etapa de postratamiento MBR. Se han investigado los principales procesos de eliminación de contaminantes involucrados, estudiando la potencial eliminación de OMP por cometabolismo de los sustratos primarios (materia orgánica y azufre). Además, con objeto de mejorar los resultados previos y potenciar una mayor desnitrificación, se han realizado modificaciones en el diseño del sistema SIAM, con respecto a las investigaciones previas, añadiendo un compartimento aerobio, entre el compartimento anóxico y el de membrana utilizado en investigaciones previas (Alvarino et al., 2019; Sánchez et al., 2016; Silva-Teira et al., 2017). En dicho compartimento aerobio se emplearán partículas de soporte para fomentar el crecimiento de biopelículas, fomentando la aparición de ambientes anaerobios/anóxicos en las biopelículas y potenciando el crecimiento de microorganismos desnitrificantes y oxidadores de metano en dicha cámara aerobia.

4.2 OPERACIÓN Y CONFIGURACIÓN DEL REACTOR

Se ha operado un prototipo a escala piloto a temperatura ambiente (de 18 a 22 °C) durante 180 días, que se alimentó con un caudal de agua sintética de 140 L d⁻¹. El sistema estaba compuesto por una primera unidad anaerobia UASB de 120L de volumen, seguido de una etapa de postratamiento de MBR de 68L (Figuras 4.1 y 4.2). El reactor anaerobio UASB como el postratamiento fueron inoculados con la biomasa de la investigación previa realizada por Alvarino et al. (2019). La concentración de sólidos en suspensión totales en el reactor UASB fue de 30 g L⁻¹, y no se realizaron purgas en el reactor anaerobio. El sistema MBR fue puesto en marcha en el día de operación 26. Este sistema consiste en 3 compartimentos: un primer anóxico de 36L, un segundo aerobio de 20L, y un tercero de filtración de 12L donde se alojaba una membrana de ultrafiltración sumergida de fibra hueca de 0,9 m². La biomasa estaba presente tanto en suspensión como en biopelícula en los compartimentos anóxico y aerobio.

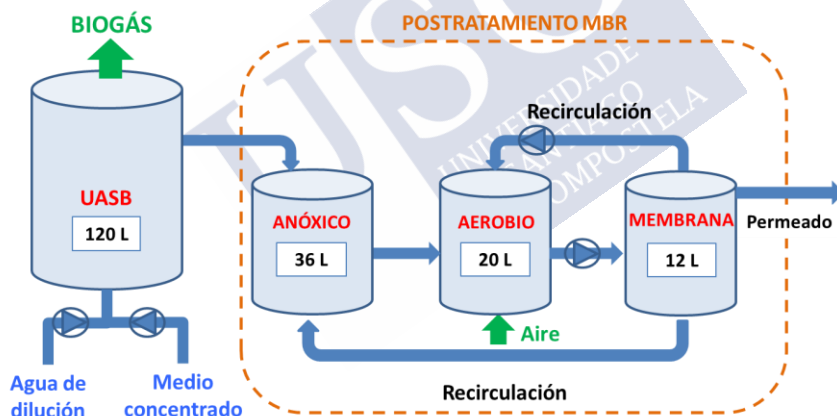


Figura 4.1. Esquema de la unidad UASB-MBR empleada que consiste en 4 partes: un reactor metanogénico UASB, un compartimento anóxico con soportes Biochip, un compartimento aerobio con soportes Biochip, y un compartimento de filtración con membrana de ultrafiltración.



Figura 4.2. Imagen de la planta piloto del sistema integrado SIAM, en un primer tanque MBR de sección rectangular, al fondo reactor UASB de sección cilíndrica.

En el compartimento anóxico se dispuso agitación mecánica en continuo, mientras en compartimento aerobio se aireó por medio de 2 soplantes GP-30S (Hiblow) y la membrana se dotó de aireación interna continua. La membrana empleada (ZW-10 Zenon ultrafiltration module) con un tamaño de poro de $0,04\ \mu\text{m}$, se operó en ciclos de 7 minutos de permeado y 0,5 minutos de contralavado. El uso de una membrana de ultrafiltración tiene como objetivo evitar el lavado de biomasa del sistema, favoreciendo el crecimiento de microorganismos con bajos tiempos de duplicación como son n-damo y anammox. En los compartimentos anóxico y aerobio se empleó el mismo soporte semiflexible poroso (Mutag Biochip, Multi Umwelttechnologie A.G., Alemania). El sistema MBR se puso en marcha con un volumen aparente de Biochip del 20% en el compartimento aerobio y del 17% en el compartimento anóxico.



Figura 4.3. Soporte plástico semi-rígido Biochip.

La unidad anaerobia UASB se alimentó con un medio sintético, simulando agua residual de baja carga, compuesto por leche desnatada diluida con agua de red como fuente de carbono, bicarbonato de sodio para mantener alcalinidad (960 mg L^{-1}), cloruro de amonio como fuente de nitrógeno (18 mg L^{-1}), y una relación de compuestos traza con la misma composición que Silva-Teira et al. (2017) y los siguientes microcontaminantes orgánicos en concentraciones de $10 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$: CBZ, DZP, BPA, IBP, NPX, DCF, ERY, ROX, SMX, TMP, E1, E2, EE2, TCS y FLX. Con el fin de estudiar el impacto de compuestos de azufre en el sistema, se distinguen 2 períodos de operación: Período 1, sin adición de azufre (días de operación 0-96) y Período 2, con adición de $50 \text{ mg SO}_4^{2-}\text{-S L}^{-1}$ (días de operación 97-180).

Se aplicaron 2 corrientes de recirculación diferenciadas en el postratamiento para alcanzar eliminaciones altas de nitrógeno, combinando tanto recirculación interna desde el compartimento de filtración hacia el anóxico, como externa desde el compartimento de filtración hacia el aerobio (siendo respectivamente la relación de recirculación interna de 3,5 y la externa de 1). El valor de recirculación interna de 3,5 es similar al obtenido como óptimo por Silva-Teira et al. (2017) para maximizar las eliminaciones de metano disuelto y nitrógeno total. Se purgaron 300 mL diarios de biomasa en suspensión para mantener la concentración de sólidos en el sistema y con ello se fija el TRS en 226 d.

4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.3.1 Resultados generales

Durante los 180 días de operación al sistema integrado SIAM se le aplicó un caudal de alimentación de $138 \pm 14 \text{ L d}^{-1}$, a una temperatura entre 18 y $20 \text{ }^\circ\text{C}$, compuesto por concentraciones de DQO_T y DQO_S de 1042 ± 226 y $893 \pm 234 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente. El TRH observado fue de $21 \pm 2 \text{ h}$ en la unidad UASB y de $12 \pm 1 \text{ h}$ en el postratamiento MBR.

En la etapa anaerobia se mantuvo un pH de $7,2 \pm 0,3$ durante toda la operación. La eliminación de DQO en el conjunto global del sistema híbrido se situó en el $99 \pm 2\%$, siendo la mayor parte eliminada en la etapa anaerobia, un $92 \pm 4\%$ durante el Período 1 y un $88 \pm 6\%$ durante el Período 2. La eliminación de DQO en el sistema UASB fue bastante estable, pero en el día de operación 49 se observa una caída drástica en la eliminación de DQO, siendo esta mayor en el efluente del UASB, 678 mg L^{-1} que la determinada en influente, 467 mg L^{-1} . Se observó un incremento notable en la presencia de AGV en el efluente del sistema UASB, 170 mg L^{-1} , y una caída del porcentaje de metano en biogás del 80 al 70%, recuperándose rápidamente dicha unidad.

El biogás enriquecido en metano, generado en la etapa del reactor UASB, tuvo la siguiente composición: $76 \pm 4\% \text{ CH}_4$, $16 \pm 4\% \text{ CO}_2$ y $8 \pm 3\% \text{ N}_2$; durante el Período 2 se detectó adicionalmente un 0,5% de H_2S en el biogás, a causa de la reducción del ion sulfato a sulfuro de hidrógeno. Los balances de masa realizados a la DQO en la etapa anaerobia, teniendo en cuenta tanto el metano disuelto como el metano presente en el biogás, mostraron que alrededor de un 75% de la materia orgánica alimentada se transformara en metano.

Las concentraciones de DQO_T y DQO_S en el efluente del UASB fueron, respectivamente 85 ± 31 y $31 \pm 15 \text{ mg L}^{-1}$ durante el Período 1, y 112 ± 36 y $59 \pm 21 \text{ mg L}^{-1}$, durante el Período 2, sin tener en cuenta la demanda teórica de oxígeno aportada por el metano disuelto. Además, durante el Período 2 se observó a la salida del UASB una concentración de H_2S de $14 \pm 3 \text{ mg S L}^{-1}$. En la oxidación de HS^- (Buisman et al., 1991) se determina que 1 mg de S secuestra 2 mg de DQO en forma soluble. Ello implica que la concentración observada de H_2S en el efluente del UASB representa una DQO_S de 28 mg L^{-1} , lo que justifica la subida media observada de DQO_T y DQO_S de 27 y 28 mg L^{-1} , respectivamente, del Período 2. El efluente del MBR se caracterizó por la ausencia de sólidos debido al rendimiento de la membrana y la baja concentración de DQO_T observada, de $9 \pm 7 \text{ mg L}^{-1}$, siendo el valor más elevado de 23 mg L^{-1} .

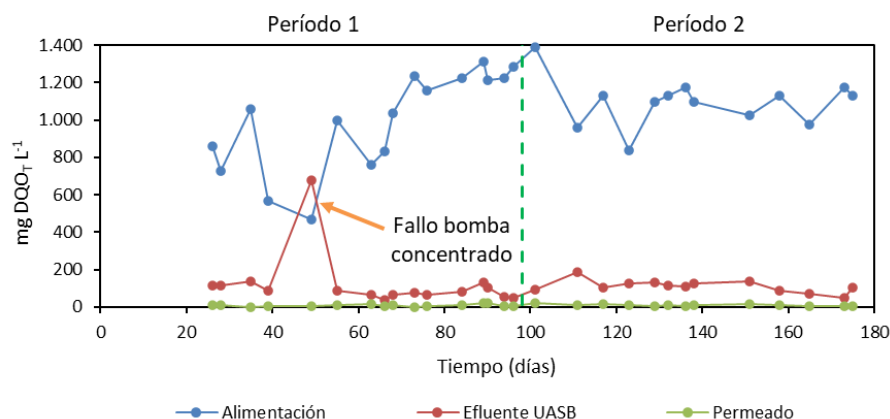


Figura 4.4. Evolución de la DQO₇ en alimentación, efluente UASB y permeado final del sistema híbrido SIAM.

Los valores de potencial oxidación-reducción, medidos en el compartimento anóxico, variaron entre -19 y -172 mV. El oxígeno disuelto medio medido en los compartimentos anóxico, aerobio y de filtración del MBR fue respectivamente de $0,34 \pm 0,05$, $1,2 \pm 0,6$ y $3,3 \pm 1,8$ mg O₂ L⁻¹. La concentración de SSTLM y SSVLM determinada en el compartimento anóxico fue, respectivamente, de $7,6 \pm 1,5$ y $5,8 \pm 1,2$ mg L⁻¹, y de $10,1 \pm 2,1$ y $7,6 \pm 1,8$ mg L⁻¹ en el compartimento de filtración.

4.3.2 Eliminación de metano disuelto

La concentración media de metano disuelto medida en el efluente del UASB ha sido de $27,8 \pm 6,1$ y $30,2 \pm 6,5$ mg L⁻¹ durante los Períodos 1 y 2, respectivamente (Figura 4.5), suponiendo el $14 \pm 4\%$ del metano generado en dicho sistema.

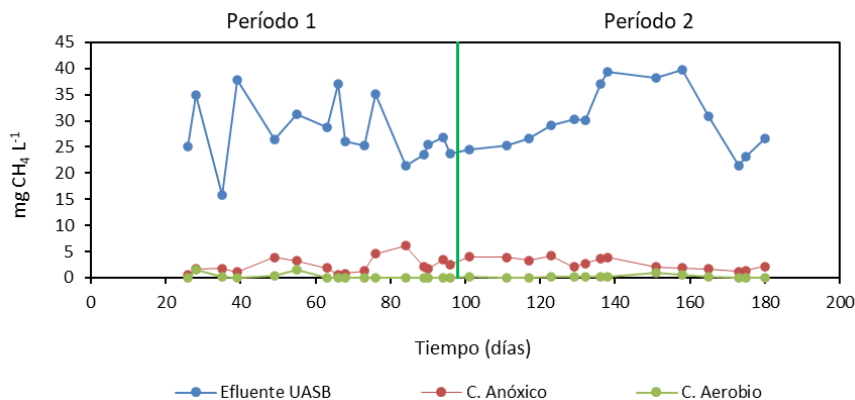


Figura 4.5. Evolución de la concentración medida de metano disuelto en el efluente del UASB, compartimento anóxico y compartimento aerobio.

Más del 70% del metano disuelto presente en el efluente del UASB se eliminó en el compartimento anóxico del postratamiento MBR, siendo las eficacias de eliminación de metano disuelto del $78 \pm 11\%$ (Período 1) y $68 \pm 6\%$ (Período 2). La presencia de sulfuro de hidrógeno en el efluente durante el período 2, no causó aparentemente ningún efecto en la eliminación de metano, ya que durante ese período se observó una mayor concentración de metano disuelto en el efluente del UASB; las velocidades de eliminación de metano disuelto fueron muy similares en ambos períodos, siendo respectivamente de 108 ± 26 y 109 ± 27 $\text{mg CH}_4 \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ para los Períodos 1 y 2. Las concentraciones de metano disuelto presentes en el compartimento anóxico fueron de $2,7 \pm 1,1$ mg L^{-1} en el Período 2 y $2,0 \pm 1,0$ mg L^{-1} en el Período 1.

En estudios previos empleando el sistema SIAM, Silva-Teira et al. (2017) obtuvo eliminaciones superiores de metano disuelto en el compartimento anóxico, que estaban relacionadas directamente con el caudal alimentado, obteniendo mayores eliminaciones a mayores caudales. Para un caudal de 355 L d^{-1} alcanzó una velocidad de eliminación de metano disuelto de 195 ± 17 $\text{mg CH}_4 \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, casi el doble de la observada en este estudio. Por otra parte, otro estudio más reciente, realizado en un estudio previo con un prototipo SIAM similar al utilizado (Alvarino et al., 2019) concluyó que no hubo efecto alguno bajo la presencia de nitrito como aceptor de electrones, al igual que en el caso de sulfuro de hidrógeno para el presente estudio, obteniendo una velocidad de eliminación de metano disuelto de 64 ± 15 $\text{mg CH}_4 \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ durante la adición de nitrito, y de 101 ± 16 $\text{mg CH}_4 \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ sin adición de nitrito, atribuyéndose la menor velocidad de eliminación observada en dicho estudio a la

menor concentración de metano disuelto en salida del UASB (19 mg L^{-1} frente a 29 mg L^{-1} en este estudio).

Se podría esperar que el metano se consiguiese ser eliminado tanto por procesos de oxidación de metano aerobios y anaerobios en el compartimento anóxico. El oxígeno entra al compartimento anóxico desde el compartimento de filtración por medio de la recirculación externa. El consumo de oxígeno en el compartimento anóxico ha sido estimado en $42 \pm 17 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Si se asumiese que todo el oxígeno es consumido por las bacterias metanótrofas aerobias, y teniendo en cuenta una relación estequiométrica de consumo de oxígeno en la oxidación aerobia del metano de $2 \text{ g O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ CH}_4$, se obtiene que la velocidad de oxidación aerobia de metano es de $84 \pm 34 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, lo que justificaría aproximadamente un 80% de la eliminación de metano observada en dicha cámara. Una pequeña fracción podría haber sido oxidada de forma anaerobia mediante microorganismos n-damo, así como a través de la oxidación hipóxica de metano unida a procesos de desnitrificación (HYME-D) (Cao et al., 2019).

4.3.3 Impacto del sulfuro de hidrógeno en la eliminación de nitrógeno

Una de las problemáticas a resolver en los efluentes en los tratamientos anaerobios metanogénicos de aguas residuales, es la presencia de altas cantidades de NT en el efluente, principalmente en forma de amonio. Si a este factor se suma la baja presencia de materia orgánica fácilmente biodegradable disponible, resulta imprescindible por tanto buscar otros potenciales aceptores de electrones con los que potenciar la desnitrificación. En este sentido, la presencia de compuestos de azufre en el agua residual puede ser un aliado de cara a obtener efluentes con menor NT, pero también podría suponer un problema, si el sulfuro de hidrógeno generado en la etapa UASB inhibiese alguna de las poblaciones microbianas implicadas en los procesos de eliminación tanto de nitrógeno como de metano disuelto.

La concentración de nitrógeno total observada en el efluente del UASB fue de 71 ± 19 , Período 1, y $84 \pm 10 \text{ mg NH}_4^+-\text{N L}^{-1}$ durante el Período 2, observándose una mejora gradual en la eliminación de nitrógeno a lo largo de los dos períodos (Figura 4.6). Durante el Período 2 el sulfuro de hidrógeno estuvo presente en el efluente del UASB en una concentración de $14 \pm 3 \text{ mg H}_2\text{S-S L}^{-1}$, siendo la concentración observada en el compartimento anóxico de $0,04 \pm 0,03 \text{ mg H}_2\text{S-S L}^{-1}$ y de $0,02 \pm 0,02 \text{ mg H}_2\text{S-S L}^{-1}$ en el efluente final del postratamiento, por lo que prácticamente todo el

ion sulfuro se ha oxidado, observando un incremento de ion sulfato. Los procesos que pueden estar envueltos en la eliminación de nitrógeno son diversos, como pueden ser la desnitrificación heterótrofa convencional, procesos de oxidación aerobia o anaerobia de metano y desnitrificación autótrofa mediante microorganismos anammox o sulfuro-oxidantes. Durante los días de operación con las máximas eliminaciones de nitrógeno estables al final de cada período, las concentraciones de NT en el permeado fueron 43 ± 8 mg NT L⁻¹ al final del Período 1, y 12 ± 1 mg NT L⁻¹ al final del Período 2. Los resultados de eliminación de NT al final del Período 1, son de unos $40,2 \pm 5,0$ mg NT L⁻¹, valores muy superiores a los observados de 15-20 mg NT L⁻¹ por Sánchez et al. (2016) o Silva-Teira et al. (2017) en los prototipos SIAM operados anteriormente, que, aunque contenían una etapa aerobia de filtración con un volumen equivalente al de suma de volúmenes de cámara aerobia y cámara de membranas del nuevo prototipo SIAM, carecían específicamente de la cámara aerobia con soportes en suspensión.

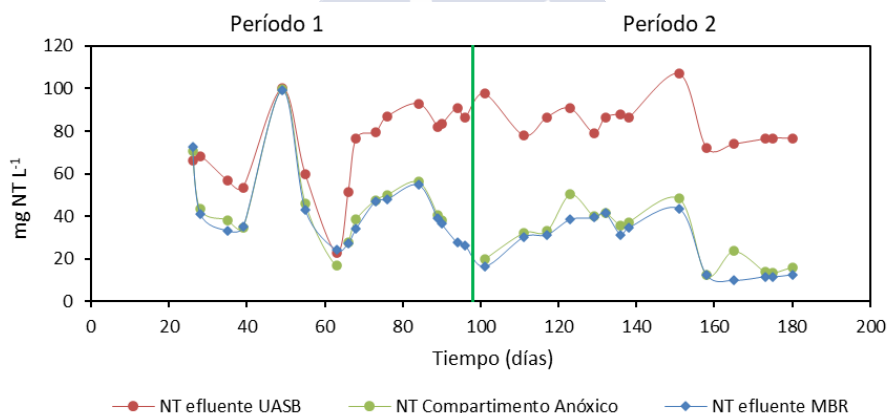


Figura 4.6. Evolución del NT en las diferentes etapas del proceso SIAM: efluente UASB, compartimento anóxico y efluente final postratamiento MBR.

Durante los primeros 151 días experimentales de operación se observó la presencia de nitrito en el permeado del SIAM, en concentraciones comprendidas entre 0,1 y 9,5 mg NO₂⁻-N L⁻¹, no detectándose dicho compuesto desde el día 151 hasta el final de la operación. El sistema alcanzó una alta nitrificación del amonio en las etapas aerobias del postratamiento tras el día de operación 35, no detectándose amonio en el efluente final entre los días 35 y 49, y desde el día 148 hasta el final de la operación. A destacar que en el día de operación 49 se detecta un aumento súbito de la concentración de amonio en el efluente del UASB de 100 mg NH₄⁺-N L⁻¹ así como de

NT en el permeado, produciéndose una inhibición casi total del proceso de nitrificación, al caer la presencia de aniones de nitrógeno en permeado de unos 40 mg L⁻¹ observados en los días previos hasta menos de 4 mg L⁻¹ observándose amonio en efluente hasta el día de operación 63 en que desciende a unos 2 mg N L⁻¹. Además, este hecho coincide con la caída en la eficacia de eliminación de DQO en la unidad UASB señalada anteriormente. La pérdida de eficacia de eliminación de materia orgánica del UASB y de NT en el SIAM en el día 49 se debió a un problema con la bomba de medio concentrado usada, que alimentó más caudal del fijado. Aunque el dato puntual de la DQO medida para ese día, no parezca corroborar dicho hecho, se observó un aumento ya señalado en la presencia de NT y AGV en el efluente del UASB, así como de la producción de gas, que pasó de unos 30 L d⁻¹ en los días previos a más de 50 L d⁻¹ en el día 49 de operación, disminuyendo el porcentaje de CH₄ en el biogás que pasaría del 80 al 70%. En todo caso, a partir del día de operación 63 se observa una rápida estabilización del sistema y un aumento rápido de la eliminación de NT, alcanzando eliminaciones de NT superiores de 40 mg L⁻¹ a partir del día de operación 68.

Tras la adición de azufre al sistema, se detectaron dos períodos de inhibición de bacterias amonio oxidantes, en los días de operación 111 y 136 (Figura 4.7). Tanto en el Período 1 como en el Período 2 se produjeron episodios de cortes puntuales del suministro eléctrico a las bombas de circulación y recirculación entre cámaras y de soplantes, teniendo lugar el estancamiento del licor de mezcla en zonas sin aireación. Estos cortes de pequeña duración (horas) no tienen apenas impacto en el sistema durante el Período 1, pero sí en el Período 2. Es probable que una fracción del ion sulfato se haya reducido en dichas condiciones, de nuevo, a ion sulfuro, conocido tóxico para bacterias oxidantes de amonio y nitrito. En este sentido Bejarano-Ortiz et al (2015) observaron la inhibición del 50% de la nitrificación, realizando ensayos en discontinuo con biomasa de un reactor RTCA alimentado con el medio Silva et al. (2009), usando concentraciones de 3,5 mg H₂S-S L⁻¹. Este efecto inhibitorio no se observó para bacterias nitrito oxidantes, al no observarse la acumulación de nitrito y sí la producción de 16 mg N L⁻¹ de ion nitrato, durante un período en el que se acumulan unos 20 mg N L⁻¹ de ion amonio (días 111-151), poniendo de manifiesto la importancia de asegurar una operación continua, sin fallos en recirculaciones y aireaciones, en alimentaciones en las que estén presentes compuestos de azufre.

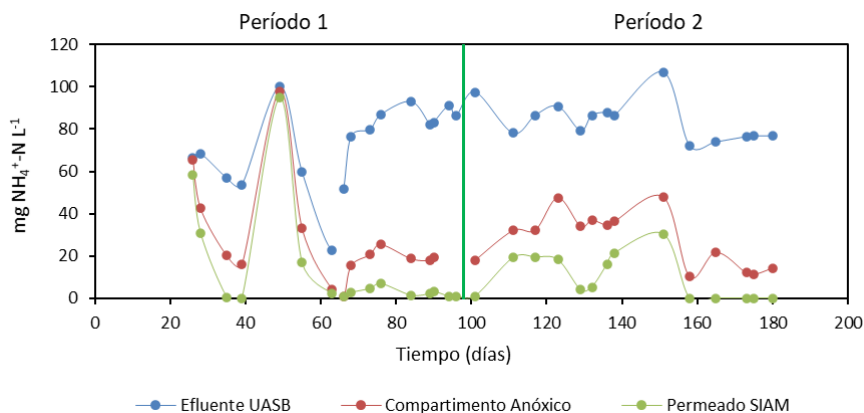


Figura 4.7. Evolución del ion amonio en el efluente del UASB, compartimento anóxico y efluente final del postratamiento SIAM.

A pesar de los riesgos asociados a la potencial inhibición en el proceso de nitrificación, señalados previamente, el proceso de desnitrificación se vio afectado positivamente por la presencia de compuestos de azufre. Las eliminaciones de NT para el conjunto del postratamiento MBR fueron de $40,2 \pm 5,0 \text{ mg NT L}_{\text{alimentación}}^{-1}$ en el Período 1 y $63,4 \pm 2,0 \text{ mg NT L}_{\text{alimentación}}^{-1}$ para el Período 2, (Figura 4.8). Estos valores suponen una eliminación de NT comprendida entre el 41 y 56% para el Período 1, y superior al 80% para el Período 2. Por tanto, la presencia de sulfuro de hidrógeno, como un dador de electrones extra, contribuyó a mejorar la capacidad de eliminación de nitrógeno del postratamiento MBR.

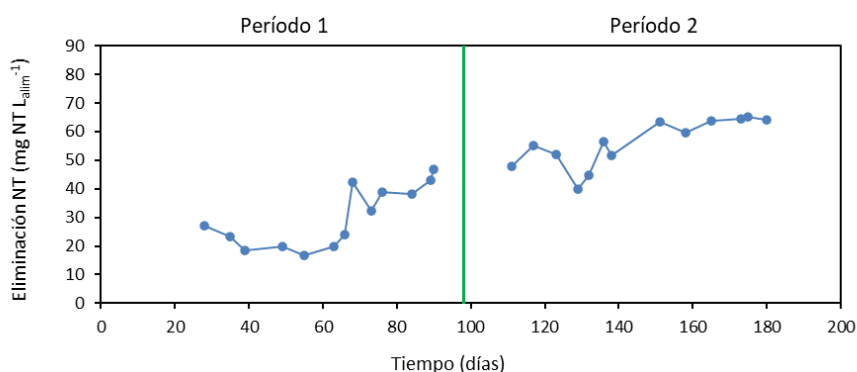


Figura 4.8. Eliminación global de nitrógeno total observada para el conjunto del postratamiento SIAM.

Las velocidades de eliminación de nitrógeno en la etapa de postratamiento MBR, referidas al volumen de la cámara anóxica, fueron de $134,1 \pm 18,8$ y $191,9 \pm 10,7$ mg NT L⁻¹ d⁻¹ para los Períodos 1 y 2, respectivamente.

La presencia del ion sulfuro supuso una mejora de las eliminaciones de nitrógeno durante el Período 2. Suponiendo que el sulfuro se oxidase principalmente a ion sulfato en la cámara anóxica con cada gramo de azufre como sulfuro se podrían desnitrificar 0,7 g de nitrógeno nítrico (Cardoso et al., 2006). Considerando el ion nitrato como principal aceptor de electrones en la cámara anóxica del sistema SIAM, se realizaron los balances para determinar la potencial eliminación de NT asociado a procesos de desnitrificación heterótrofa convencional y asociada a procesos de desnitrificación autótrofa usando respectivamente materia orgánica e ion sulfuro. De esta forma, se necesitarían 4,98 g DQO g⁻¹ N eliminado (Metcalf&Eddy et al., 2014) y 1,42 g S g⁻¹ N eliminado (Cardoso et al., 2006). Realizando un balance entre la DQO_T de entrada al postratamiento MBR y teniendo presentes las concentraciones de DQO observadas en los dos períodos en el permeado, 9 y 10 mg L⁻¹, se puede estimar que 1 mg L⁻¹ estaría asociado con compuestos reducidos de azufre, del cual se ha determinado analíticamente SH₂. Con dichas cuentas y asumiendo la completa utilización de la DQO eliminada, para la desnitrificación, se podría justificar que la materia orgánica sería responsable de un $33,5 \pm 8,7\%$ de la desnitrificación durante el Período 1 ($43,5 \pm 20,3$ mg N L⁻¹ d⁻¹) y de tan sólo un $16,3 \pm 9,3\%$ en el Período 2 ($31,2 \pm 15,6$ mg N L⁻¹ d⁻¹). Para el Período 2 se estima que un 18% se podría eliminar mediante desnitrificación autótrofa con sulfuro, lo que pone de manifiesto la existencia de otros dadores de electrones (amonio y metano) contribuyendo a la eliminación de nitrógeno. La presencia de metano disuelto, usando procesos de desnitrificación mediante metanótrofos aerobios podría justificar, de producirse, una eliminación del 56,3% de NT en el Período 1, y del 39,7% de NT en el Período 2. En el Período 1, en el compartimento anóxico se observaron unas velocidades de eliminación de amonio, nitrito y nitrato en cámara anóxica del MBR de $50,5 \pm 21,1$, $52,8 \pm 9,5$ y $36,7 \pm 13,0$ mg N L⁻¹ d⁻¹. La desaparición observada de amonio en dicho compartimento pone de manifiesto, una vez más, una posible ruta de eliminación de NT vía proceso anammox. La suma de estas velocidades de eliminación, 140 mg N L⁻¹ d⁻¹, realizando el balance de cada uno de los iones para la cámara anóxica, concordaría con las velocidades de eliminación de NT señaladas previamente de $134,1$ mg NT L⁻¹ d⁻¹, que se calculan teniendo en cuenta la entrada y salida de NT, medida en efluente del UASB y permeado del MBR.

En el Período 2 las velocidades de eliminación de amonio, nitrito y nitrato, calculadas realizando un balance de cada uno de estos iones en cámara anóxica, fueron de $60,5 \pm 14,9$ y $137,5 \pm 12,9$ mg N L⁻¹ d⁻¹, mientras que se observó una generación aparente de nitrito de $11,1 \pm 4,2$ mg N L⁻¹ d⁻¹. Por tanto, la velocidad de eliminación observada de nitrógeno en el compartimento anóxico fue de $187,0$ mg N L⁻¹ d⁻¹, similar a la obtenida de $191,9$ mg NT L⁻¹ d⁻¹, teniendo en cuenta el NT medido en efluente del UASB y permeado del MBR, y corroborando, de nuevo, la posible eliminación de NT mediante el proceso anammox. Realizando balances de materia empleando el ion sulfuro, la velocidad de eliminación de nitrato que podría justificarse empleando este dador de electrones sería de $34,7 \pm 10,1$ mg N L⁻¹ d⁻¹, un 18,1% del total observado en el compartimento anóxico. El incremento de la velocidad de desnitrificación observado en el Período 2 fue de $57,8$ mg NT L⁻¹ d⁻¹, por lo que se incrementó la actividad de otras vías de desnitrificación. La formación de nitrito en el compartimento anóxico pudo deberse a que, en los procesos de desnitrificación autótrofa de nitrógeno con sulfuro, la velocidad de reducción de nitrato a nitrito fuese más rápida que la reducción de nitrito a nitrógeno gas como ya señalaron otros autores (Reyes-Avila et al., 2004) especialmente con relaciones S/N por debajo de 0,94 (Huang et al., 2021). Existen procesos de eliminación autótrofa de nitrógeno empleando sulfuro, como el proceso SANI, que puede alcanzar eliminaciones del 90% de nitrógeno, usando nitrato como aceptor de electrones, si la relación de alimentación al sistema es de al menos $1,6$ g S g⁻¹ N (Wang et al., 2009). La relación empleada en este estudio en el Período 2 fue de aproximadamente $0,3$ g S g⁻¹ N. Como cabría esperar, la contribución de la desnitrificación autótrofa con sulfuro fue menor debido a la baja relación S/N aplicada, pero la baja relación aplicada promovería la reducción de nitrato a nitrito, mediante bacterias autótrofas sulfuro oxidantes, ion que a su vez podría ser usado como aceptor de electrones por otros grupos tróficos (heterótrofos, metanótrofos aerobios/anaerobios y anammox).

Tras observarse la posible contribución de la vía de reducción de nitrato a nitrito con azufre, se realiza una estimación de la eliminación de nitrógeno asumiendo que todo el sulfuro se emplease para la reducción de nitrato a nitrito, y el ion nitrito se consumiese vía anammox con amonio. Se podrían reducir $1,75$ g NO₃⁻-N g⁻¹ S, generando otros $1,75$ g NO₂⁻-N. Por tanto, teniendo en cuenta la velocidad de eliminación de sulfuro, se pueden reducir a nitrito $86,7 \pm 25,2$ mg N L⁻¹ d⁻¹. Con este potencial de producción de nitrito, se podrían oxidar de forma anaerobia unos $65,7 \pm 19,1$ mg NH₄⁺-N L⁻¹ d⁻¹. Ello implica que la velocidad de eliminación máxima del proceso conjunto de reducción de nitrato a nitrito vía sulfuro y anammox, empleando

todo el sulfuro para reducir nitrato a nitrito, sería en torno a $152,4 \pm 22,2 \text{ mg N L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ (teniendo en cuenta la suma de nitrito y amonio). Una posible contribución de esta vía de desnitrificación podría justificar una fracción del nitrógeno eliminado que no se explica en los balances realizados previamente.

En el conjunto de las etapas aerobias, los compartimentos aerobio y de membrana, se observó una eliminación de nitrógeno de $1,215 \pm 0,799 \text{ g N d}^{-1}$ para el Período 1, y $1,546 \pm 0,572 \text{ g N d}^{-1}$ para el Período 2. Teniendo en cuenta los valores de eliminación de nitrógeno del conjunto del postratamiento MBR de $4,523 \pm 1,191$ y $6,907 \pm 0,386 \text{ g NT d}^{-1}$, en los Períodos 1 y 2, respectivamente, se obtiene que en el Período 1 el 21% de la eliminación de nitrógeno tuvo lugar en las etapas aerobias, mientras que en el Período 2 ese valor fue del 18% debido al incremento de las velocidades de desnitrificación en el compartimento anóxico. La eliminación de nitrógeno en las etapas aerobias podría asociarse a la presencia de la biopelícula del compartimento aerobio, poniendo de manifiesto la importancia de modificar el sistema SIAM con respecto a estudios previos, separando físicamente los compartimentos aerobio y de membrana, para facilitar el uso de biopelículas.

Los estudios previos desarrollados con la tecnología SIAM se realizaron sin separar físicamente el compartimento aerobio del de membrana, básicamente la cámara de membranas tenía un volumen equivalente a la suma de la cámara de membranas y la nueva cámara aerobia de la experimentación presentada con este capítulo y, por ende, sin el uso de biopelícula aerobia. Silva-Teira et al. (2017), observó una relación entre las eliminaciones de metano disuelto y nitrógeno empleando nitrato como principal aceptor de electrones, obteniendo eliminaciones en el postratamiento MBR de unos 15 mg NT L^{-1} . Alvarino et al. (2019) obtuvo eliminaciones de nitrógeno similares en el período en que el nitrato era el principal aceptor de electrones (sin adición externa de nitrito); sin embargo observó una mejora en la eliminación de nitrógeno con la adición externa de nitrito como aceptor de electrones, alcanzando eliminaciones de nitrógeno de hasta 35 mg NT L^{-1} , sin que la presencia de nitrito afectase a la eliminación de metano disuelto. En cuanto a velocidades de eliminación de nitrógeno, el primer autor obtuvo un valor de $149 \text{ mg NT L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, mientras que el segundo obtuvo $78 \text{ mg NT L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ para el período donde el nitrato era el principal aceptor de electrones, como consecuencia de un menor caudal aplicado y carga de metano disuelto en la entrada al postratamiento MBR. En este estudio se alcanzaron velocidades de eliminación de nitrógeno mayores en ambos períodos, poniendo de manifiesto el papel de vías de desnitrificación adicionales a la

heterótrofa convencional y a la contribución de la oxidación del metano en el Período 1, y el papel de la desnitrificación autótrofa en el Período 2.

4.3.4 Eliminación de microcontaminantes

La Figura 4.9 resume las eficacias de eliminación de microcontaminantes para los 15 compuestos estudiados observadas en el sistema SIAM. En general se obtuvieron eficiencias de eliminación superiores al 80% para la mayor parte de los compuestos estudiados, sin observarse diferencias entre los Períodos 1 y 2, por lo que no hubo impacto tras la adición de compuestos de azufre en las concentraciones de OMPs estudiadas. Este comportamiento de altas eliminaciones de OMPs ya se observara previamente en un estudio anterior realizado con el proceso SIAM y otros sistemas integrados (Alvarino et al., 2019; Phan et al., 2014) confirmando la robustez del sistema para eliminar gran parte de los OMPs

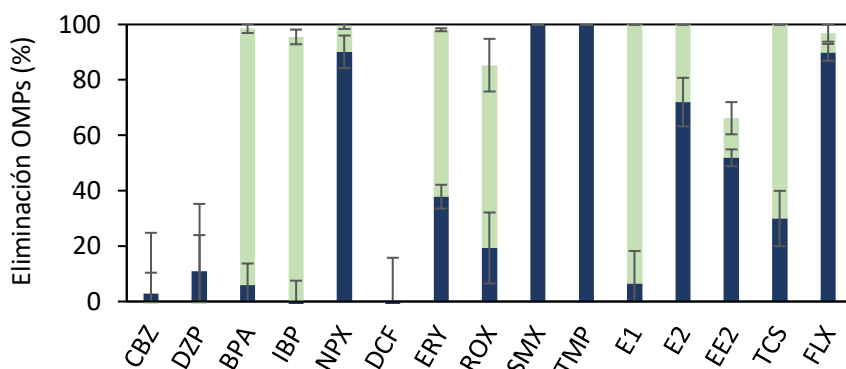


Figura 4.9. Eficiencias de eliminación de microcontaminantes observadas en la etapa anaerobia UASB (azul) y en el postratamiento MBR (verde).

En función de su grado de eliminación y del ambiente redox donde ésta se produjo, se pudieron distinguir 4 grupos de OMPs: 1) compuestos que se eliminaron principalmente en la etapa anaerobia (NPX, SMX, TMP y FLX); 2) compuestos eliminados principalmente en el postratamiento MBR (BPA, IBP y E1); 3) aquellos compuestos eliminados de forma combinada en la etapa UASB y en el postratamiento MBR (ERY, ROX, E2, EE2 y TCS); y 4) aquellos compuestos que muestran un carácter recalcitrante y son persistentes (CBZ, DZP y DCF).

Atendiendo a la naturaleza de los compuestos, FLX es un compuesto lipofílico que presentó una eliminación del 90% en la etapa anaerobia, que podría estar relacionada con la alta sorción que presentan este tipo de compuestos en el lodo metanogénico, con valores iguales o superiores al 75% (Gonzalez-Gil et al., 2018). Se podría esperar el mismo comportamiento de TCS, otro compuesto lipofílico, ambos con log (Kd) mayor de 3 (3 en el caso de FLX y 3,7 para TCS) (Gonzalez-Gil et al., 2018). Sin embargo, en este estudio las eliminaciones en la etapa anaerobia fueron del 30%, a pesar de un mayor log (Kd). Adicionalmente, estos compuestos se eliminaron parcialmente en el postratamiento MBR (7% y 70%, respectivamente), eliminándose prácticamente en su totalidad en el conjunto del sistema SIAM.

En la etapa anaerobia del UASB se observó la eliminación de los compuestos fácilmente biotransformables bajo potenciales de oxidación-reducción anaerobios, como NPX, SMX y TMP (Alvarino et al., 2016b; Carballa et al., 2007), además del mencionado previamente FLX. Ello justifica las eficacias de eliminación observadas en el UASB del 90% para el antiinflamatorio NPX, y del 100% para los antibióticos SMX y TMP.

Para el antiinflamatorio IBP se obtuvieron eficacias de eliminación elevadas, en torno al 95%, en el postratamiento MBR bajo condiciones anóxicas-aerobias. La mayor parte de esta eliminación se puede atribuir a las etapas aerobias dado que se ha comprobado que este compuesto se elimina fácilmente en ambientes de potencial oxidación-reducción aerobios (Suarez et al., 2010). La eliminación observada de IBP mejoró los resultados obtenidos previamente en nuestros laboratorios con un equipo experimental similar, compuesto de una etapa UASB y un postratamiento con MBR aerobio de igual volumen al usado en este experimento (Alvarino et al., 2016a) en el que se obtuvieron eliminaciones de IBP del 82%. Esta mejora pudo estar relacionada con la presencia del compartimento aerobio adicional y a las mayores actividades de microorganismos nitrificantes observadas en este estudio (60% frente a un 99%). En este sentido, Fernandez-Fontaina et al. (2016) señalara previamente que el proceso de nitrificación estimulaba especialmente la eliminación de este microcontaminante.

Tanto E1 como E2 son hormonas naturales que se suelen eliminar fácilmente mediante tratamiento biológico. Se ha observado el mismo comportamiento en la eliminación de la hormona E1 en los 2 sistemas mencionados (82% para un UASB y postratamiento aerobio, y 93% para este estudio). En otro estudio empleando cultivos enriquecidos en microorganismos nitrificantes, se obtuvieron eliminaciones

superiores al 89% para los antibióticos ERY y ROX y superiores al 99% para las hormonas naturales (Suarez et al., 2010), implicando una contribución elevada de las etapas aerobias a las altas eliminaciones globales observadas mayores al 80% para ROX y cercanas al 100% para ERY, E1 y E2. En el caso de las hormonas E1 y E2, la presencia de grupos funcionales de dadores de electrones (-OH) en su estructura química explica también su eliminación en condiciones aerobias (Grandclément et al., 2017). E1 se biotransformó casi por completo en las etapas anóxica-aerobia, mientras que E2 se eliminó principalmente en el UASB (más de un 70%), eliminándose la fracción restante en el postratamiento MBR. Este comportamiento coincide con el observado por Joss et al. (2004), que comparó la eliminación de E1 en condiciones aerobias y anaerobias, observando mayores biotransformaciones con potenciales de oxidación-reducción positivos.

La eliminación de BPA, un conocido disruptor endocrino, tuvo lugar principalmente en el postratamiento MBR, mostrándose recalcitrante bajo condiciones anaerobias. Su degradación puede estar relacionada con la actividad nitrificante del postratamiento (Guerra et al., 2015; Yang et al., 2016), por lo que las elevadas eficiencias de nitrificación del postratamiento pueden ser el motivo de su eliminación. Los resultados obtenidos por Phan et al. (2014) corroboran esa afirmación, pues obtuvo eliminaciones de BPA bajas en condiciones anóxicas y despreciables en condiciones anaerobias.

4.3.5 Microbiología

El nitrito estuvo presente durante toda la operación en el compartimento anóxico, en concentraciones comprendidas entre 0,1 y 0,2 mg $\text{NO}_2^- \text{-N L}^{-1}$ durante el Período 1 y entre 0,1 y 0,9 mg $\text{NO}_2^- \text{-N L}^{-1}$ durante el Período 2. La presencia de este ion, así como la eliminación observada de amonio en cámara anóxica, indicó la posibilidad de desarrollo de microorganismos anammox en la biopelícula.

Se analizaron al final de cada período (días de operación 96 y 180) las principales comunidades bacterianas presentes tanto en biomasa en suspensión, como en los 2 tipos de biopelícula, encontrando diferencias significativas entre la biomasa en suspensión y las 2 biopelículas. Las familias dominantes fueron microorganismos heterótrofos como la clase *Chlorobi SJA-28* y la familia *Saprospiraceae*. Se detectaron abundancias de microorganismos n-damo bacteria muy bajas (del orden de 10^{-6}) tanto en biopelícula anóxica como aerobia, lo que resalta la dificultad de

CAPÍTULO 4

fomentar el crecimiento de estos microorganismos en sistemas híbridos, poniendo de manifiesto la necesidad de controlar unas condiciones anóxicas/anaerobias. Los microorganismos metanótrofos aerobios presentes, principalmente pertenecientes a la familia *Methyloccoccaceae* y *Methylophilaceae* (este último puede metabolizar tanto metano como metanol, producto de oxidación del metano), estuvieron presentes de manera equilibrada en las 3 conformaciones de biomasa estudiadas durante el Período 1, en el cual sus abundancias fueron 4,1% en biomasa en suspensión, 3,9% en biopelícula anóxica, y 3,6% en biopelícula aerobia. En el Período 2 esos valores fueron, respectivamente, del 1,8%, 3,4% y 8,1%. La presencia de compuestos de azufre, así como los episodios de acumulación de sulfuro, pudieron haber afectado negativamente a estos microorganismos en biomasa en suspensión, mostrándose más robustos en la biopelícula. Estos resultados ponen de manifiesto la importancia de la biopelícula tanto anóxica como aerobia, recalcando la importancia de la modificación realizada a este prototipo SIAM separando físicamente la etapa de filtración del compartimento aerobio, posibilitando el empleo de biopelícula en dicha cámara.

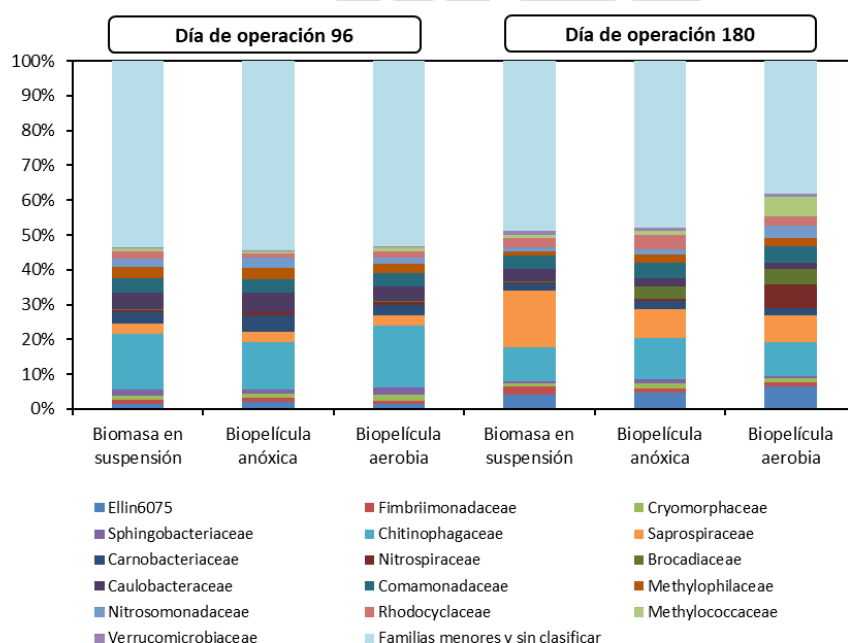


Figura 4.10. Composición de las familias de bacterias de la comunidad microbiana presentes en las tres conformaciones de biomasa con abundancias relativas superiores al 1%.

Los microorganismos anammox, como *Candidatus Brocadia*, se detectaron al final del Período 1 con abundancias relativas del 0,3%, sin hallarse diferencia entre los 3 tipos de muestras tomadas, biopelículas anóxicas, biopelículas aerobias y biomasa en suspensión. Sin embargo, esa abundancia se incrementó considerablemente en las biopelículas durante el Período 2, donde se observó un 0,2% en biomasa en suspensión, 3,7% en biopelícula anóxica y 4,6% en biopelícula aerobia. Una vez más, se pone de manifiesto la importancia de ambas biopelículas y la separación del compartimento aerobio de la etapa de filtración.

En el Período 2 se detectó el género *Thiobacillus* en la biopelícula anóxica en cantidades residuales, que puede usar tiosulfato como dador de electrones en la desnitrificación, generando ácido sulfúrico, sugiriendo que otros compuestos de azufre distintos al sulfuro pudieron contribuir a la desnitrificación. Sin embargo, se encontraron abundancias relativas elevadas del orden *Thiobacterales*, al que pertenecen las bacterias oxidantes de sulfuro (SOB), con abundancias del 8,5% en biomasa en suspensión, 4,6% en biopelícula anóxica y 3,4% en biopelícula aerobia, sugiriendo que la principal vía de desnitrificación con azufre empleó sulfuro como dador de electrones. Además de las vías de desnitrificación autótrofas con azufre o anammox, nitrito y nitrato pudieron ser eliminados por desnitrificantes heterótrofos, como las familias *Comamonadaceae*, con abundancias comprendidas entre 3,8 y 4,6% durante toda la operación, no habiéndose observado diferencias entre las diferentes conformaciones de biomasa.

En cuanto a los organismos nitrificantes, se observaron diferencias positivas en la biopelícula aerobia. En el Período 1, la familia *Nitrosomonadaceae*, conocida por contener bacterias amonio oxidantes, estuvo presente con un 2,4% en biomasa en suspensión, 2,7% en biopelícula anóxica y 1,8% en biopelícula aerobia. En el Período 2, esos valores fueron respectivamente del 1,2%, 1,5% y 3,3%. Muy probablemente la biopelícula aerobia contribuyese positivamente a lograr la oxidación completa de amonio observada al final del Período 2. Los organismos nitrito oxidantes, por medio del género *Nitrospira*, fueron observados con abundancias del 0,7% en biomasa en suspensión, 1% en biopelícula anóxica y 0,7% en biopelícula aerobia al final del Período 1. En el Período 2, esos valores fueron respectivamente del 0,5%, 0,5% y 6,7%. Por tanto, cabe destacar el papel que juega la biopelícula aerobia en el proceso de nitrificación.

A la vista de estos resultados, se demuestra el importante papel que desarrolla la biopelícula, tanto anóxica como aerobia, en este sistema SIAM, con un importante papel en el proceso de desnitrificación donde crecen microorganismos oxidantes de metano, microorganismos desnitrificantes autótrofos como anammox. Sin embargo, la presencia de la biopelícula aerobia no solo contribuyó a mejorar el proceso de desnitrificación, sino que también se desarrolló en ella una fracción importante de microorganismos nitrificantes, tanto oxidantes de amonio como nitrito, que puede ser un punto positivo a la hora de paliar los efectos de episodios de inhibición de la nitrificación.

4.4 CONCLUSIONES

El sistema SIAM obtuvo durante toda la experimentación eliminaciones de DQO mayores al 98% y de amonio mayores al 95% en los períodos donde no se produjo la inhibición de la oxidación aerobia de amonio. En el compartimento anóxico se detectaron velocidades de eliminación de metano disuelto comprendidas entre 75 y 135 mg CH₄ L⁻¹ d⁻¹, con porcentajes de eliminación de 60-80%. Respecto a la eliminación de OMPs, el sistema obtuvo altas eficiencias (mayores al 70%) en un amplio rango de compuestos farmacéuticos, especialmente hormonas y antibióticos debido a la combinación de potenciales oxidación-reducción (anaerobio, anóxico y aerobio) y a diferentes conformaciones de biomasa (en suspensión y biopelícula)., Como era de esperar, no se observó degradación de DZP, DCF y CBZ, conocidos compuestos recalcitrantes al tratamiento biológico, que se deberían eliminar si fuese preciso, con tecnologías de tratamiento físico-químico adecuadas (membranas de OI, ozono o carbón activo).

El uso de una cámara aerobia adicional con biopelículas permitió potenciar la eliminación de NT en el sistema SIAM, sin que se alterase para ello el volumen utilizado del equipo. La eliminación de NT se incrementó gradualmente desde los 20 hasta aproximadamente 43 mg NT L⁻¹ durante los primeros 96 días de operación, donde el sulfato no fue añadido en la alimentación.

La adición de sulfuro como un dador extra de electrones no tuvo ningún impacto en la eliminación de metano disuelto ni microcontaminantes, pero sí contribuyó a mejorar la eliminación de nitrógeno, incrementándose hasta 63 mg NT L⁻¹. El uso de partículas de soporte en las cámaras aerobias y anóxica, potenció el crecimiento de bacterias metanótrofas aerobias, microorganismos anammox y nitrificantes en las

biopelículas, con respecto a la biomasa en suspensión. Todas estas poblaciones tienen un efecto positivo tanto en la eliminación de nitrógeno como de metano disuelto, por lo que se concluye que la modificación realizada en el diseño del MBR mejora el comportamiento del proceso SIAM.

4.5 BIBLIOGRAFÍA

- Alvarino, T., Allegue, T., Fernandez-Gonzalez, N., Suarez, S., Lema, J.M., Garrido, J.M., Omil, F., 2019. Minimization of dissolved methane, nitrogen and organic micropollutants emissions of effluents from a methanogenic reactor by using a preanoxic MBR post-treatment system. *Sci. Total Environ.* 671, 165–174. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.169>
- Alvarino, T., Komesli, O., Suarez, S., Lema, J.M., Omil, F., 2016a. The potential of the innovative SeMPAC process for enhancing the removal of recalcitrant organic micropollutants. *J. Hazard. Mater.* 308, 29–36. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.01.040>
- Alvarino, T., Suárez, S., Garrido, M., Lema, J.M., Omil, F., 2016b. A UASB reactor coupled to a hybrid aerobic MBR as innovative plant configuration to enhance the removal of organic micropollutants. *Chemosphere* 144, 452–458. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.09.016>
- Alvarino, T., Suarez, S., Lema, J., Omil, F., 2018. Understanding the sorption and biotransformation of organic micropollutants in innovative biological wastewater treatment technologies. *Sci. Total Environ.* <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.09.278>
- Bejarano-Ortiz, D.I., Huerta-Ochoa, S., Thalasso, F., Cuervo-López, F. de M., Texier, A.C., 2015. Kinetic Constants for Biological Ammonium and Nitrite Oxidation Processes Under Sulfide Inhibition. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 177, 1665–1675. <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1844-3>
- Buisman, C.J.N., Jspeert, P.I., Hof, A., Janssen, A.J.H., Hagen, R. Ten, Lettinga, G., 1991. Kinetic parameters of a mixed culture oxidizing sulfide and sulfur with oxygen. *Biotechnol. Bioeng.* 38, 813–820. <https://doi.org/10.1002/bit.260380803>
- Cao, Q., Liu, X., Ran, Y., Li, Z., Li, D., 2019. Methane oxidation coupled to denitrification under microaerobic and hypoxic conditions in leach bed bioreactors. *Sci. Total Environ.* 649, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.289>

- Carballa, M., Omil, F., Ternes, T., Lema, J.M., 2007. Fate of pharmaceutical and personal care products (PPCPs) during anaerobic digestion of sewage sludge. *Water Res.* 41, 2139–2150. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.02.012>
- Cardoso, R.B., Sierra-Alvarez, R., Rowlette, P., Flores, E.R., Gómez, J., Field, J.A., 2006. Sulfide oxidation under chemolithoautotrophic denitrifying conditions. *Biotechnol. Bioeng.* 95, 1148–1157. <https://doi.org/10.1002/bit.21084>
- Fernandez-Fontaina, E., Gomes, I.B., Aga, D.S., Omil, F., Lema, J.M., Carballa, M., 2016. Biotransformation of pharmaceuticals under nitrification, nitrataion and heterotrophic conditions. *Sci. Total Environ.* 541, 1439–1447. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2015.10.010>
- Gonzalez-Gil, L., Mauricio-Iglesias, M., Serrano, D., Lema, J.M., Carballa, M., 2018. Role of methanogenesis on the biotransformation of organic micropollutants during anaerobic digestion. *Sci. Total Environ.* 622–623, 459–466. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2017.12.004>
- Grandclément, C., Seyssiecq, I., Piram, A., Wong-Wah-Chung, P., Vanot, G., Tiliacos, N., Roche, N., Doumenq, P., 2017. From the conventional biological wastewater treatment to hybrid processes, the evaluation of organic micropollutant removal: A review. *Water Res.* <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.01.005>
- Guerra, P., Kim, M., Teslic, S., Alaei, M., Smyth, S.A., 2015. Bisphenol-A removal in various wastewater treatment processes: Operational conditions, mass balance, and optimization. *J. Environ. Manage.* 152, 192–200. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2015.01.044>
- Hosseinzadeh, M., Bidhendi, G.N., Torabian, A., Mehrdadi, N., 2013. Evaluation of membrane bioreactor for advanced treatment of industrial wastewater and reverse osmosis pretreatment. *J. Environ. Heal. Sci. Eng.* 11, 1–8. <https://doi.org/10.1186/2052-336x-11-34>
- Huang, S., Yu, D., Chen, G., Wang, Y., Tang, P., Liu, C., Tian, Y., Zhang, M., 2021. Realization of nitrite accumulation in a sulfide-driven autotrophic denitrification process: Simultaneous nitrate and sulfur removal. *Chemosphere* 278, 130413–130413. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130413>
- Huiliñir, C., Acosta, L., Yanez, D., Montalvo, S., Esposito, G., Retamales, G., Levicán, G., Guerrero, L., 2020. Elemental sulfur-based autotrophic denitrification in stoichiometric S0/N ratio: Calibration and validation of a kinetic model. *Bioresour. Technol.* 307. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123229>

- Joss, A., Andersen, H., Ternes, T., Richle, P.R., Siegrist, H., 2004. Removal of estrogens in municipal wastewater treatment under aerobic and anaerobic conditions: Consequences for plant optimization. *Environ. Sci. Technol.* 38, 3047–3055. <https://doi.org/10.1021/es0351488>
- Metcalf&Eddy, Tchobanoglous, G., Stensel, D., Tsuchihashi, R., Burton, F., 2014. *Wastewater Engineering*, Fifth edit. ed. McGraw Hill, New York.
- Phan, H. V., Hai, F.I., Kang, J., Dam, H.K., Zhang, R., Price, W.E., Broeckmann, A., Nghiem, L.D., 2014. Simultaneous nitrification/denitrification and trace organic contaminant (TrOC) removal by an anoxic-aerobic membrane bioreactor (MBR). *Bioresour. Technol.* 165, 96–104. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.03.094>
- Reyes-Avila, J., Razo-Flores, E., Gomez, J., 2004. Simultaneous biological removal of nitrogen, carbon and sulfur by denitrification. *Water Res.* 38, 3313–3321. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2004.04.035>
- Sánchez, A., Rodríguez-Hernández, L., Buntner, D., Esteban-García, A.L., Tejero, I., Garrido, J.M., 2016. Denitrification coupled with methane oxidation in a membrane bioreactor after methanogenic pre-treatment of wastewater. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 91, 2950–2958. <https://doi.org/10.1002/jctb.4913>
- Silva-Teira, A., Sánchez, A., Buntner, D., Rodríguez-Hernández, L., Garrido, J.M., 2017. Removal of dissolved methane and nitrogen from anaerobically treated effluents at low temperature by MBR post-treatment. *Chem. Eng. J.* 326, 970–979. <https://doi.org/10.1016/J.CEJ.2017.06.047>
- Silva, C.D., Gómez, J., Houbbron, E., Cuervo-López, F.M., Texier, A.C., 2009. p-Cresol biotransformation by a nitrifying consortium. *Chemosphere* 75, 1387–1391. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.02.059>
- Sousa, J.C.G., Ribeiro, A.R., Barbosa, M.O., Pereira, M.F.R., Silva, A.M.T., 2018. A review on environmental monitoring of water organic pollutants identified by EU guidelines. *J. Hazard. Mater.* 344, 146–162. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2017.09.058>
- Suarez, S., Lema, J.M., Omil, F., 2010. Removal of Pharmaceutical and Personal Care Products (PPCPs) under nitrifying and denitrifying conditions. *Water Res.* 44, 3214–3224. <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2010.02.040>
- Wang, J., Lu, H., Chen, G.H., Lau, G.N., Tsang, W.L., van Loosdrecht, M.C.M., 2009. A novel sulfate reduction, autotrophic denitrification, nitrification

integrated (SANI) process for saline wastewater treatment. *Water Res.* 43, 2363–2372. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.02.037>

Yang, S., Hai, F.I., Price, W.E., McDonald, J., Khan, S.J., Nghiem, L.D., 2016. Occurrence of trace organic contaminants in wastewater sludge and their removals by anaerobic digestion. *Bioresour. Technol.* 210, 153–159. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.12.080>



CAPÍTULO 5

EVALUACIÓN DE LA TECNOLOGÍA SIAM PARA EL TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES DE LA INDUSTRIA LÁCTEA

Resumen

La tecnología SIAM se propone como una alternativa factible para minimizar los elevados costes de los tratamientos de aguas residuales de la industria láctea, que presentan una elevada carga orgánica contaminante, en términos de consumo de energía y generación de lodo de los procesos aerobios comúnmente empleados.

Para ello se operó un prototipo SIAM, compuesto por una primera etapa UASB y un postratamiento en MBR, para depurar las aguas residuales de una industria del sector lácteo. La alimentación al UASB contuvo un promedio de 1400 mg DQO L⁻¹, 66 mg NT L⁻¹ y 25 mg PT L⁻¹. Los resultados mostraron eliminaciones de DQO elevadas, un 68% en la etapa anaerobia y un 98% en el sistema global. La eficacia del sistema UASB estuvo influenciada por la temperatura, el pH de entrada, así como por la concentración de DQO alimentada. El prototipo SIAM pudo eliminar, además, un 43% del fósforo alimentado, siendo la precipitación química con sales de Ca la vía más probable. El postratamiento MBR eliminó un 70-85% del NT presentes en el efluente del UASB, usando para ello la DQO remanente presente en el efluente de la etapa anaerobia. La concentración de NT presente en el permeado fue menor a 13 mg L⁻¹ durante un largo período experimental. La producción aparente de biomasa en el SIAM fue de 0,11 g SST g⁻¹ DQO tratada, muy inferior a la que se genera mediante tratamiento biológico aerobio, generándose un biogás con un contenido del 60 al 80% de metano que se podría aprovechar para reducir el consumo de energía en la planta industrial. La tecnología SIAM generó un efluente de alta calidad, libre de sólidos en suspensión, bajo contenido en DQO que podría facilitar una potencial reutilización del agua depurada en la factoría.

ÍNDICE DE CONTENIDOS - CAPÍTULO 5

5.1 INTRODUCCIÓN	121
5.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	123
5.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	126
5.3.1 Resultados de la etapa metanogénica UASB	126
5.3.2 Eliminación de nutrientes y eficacia del postratamiento MBR.....	133
5.3.3 Comportamiento de la membrana de ultrafiltración del MBR y ensayos de ósmosis inversa	142
5.4 CONCLUSIONES	144
5.5 BIBLIOGRAFÍA	145

5.1 INTRODUCCIÓN

La industria láctea ocupa un lugar relevante, dentro de la Unión Europea, como generadora de empleo, con más de 12.000 instalaciones de procesado y 300.000 puestos de trabajo directos, siendo europeas 5 de las 10 mayores compañías mundiales del sector. Anualmente se gestionan alrededor de 164,8 Mt de leche, referido al año 2014, dentro de la UE-28. Este sector es conocido por ser un gran consumidor de energía, cerca del 80% de la energía se consume como energía térmica para calentar agua y generar vapor y el restante 20% de la energía se utiliza en forma de electricidad, para activar maquinaria, sistemas de refrigeración, ventilación e iluminación en las plantas, situándose el consumo específico de energía entre 0,1 y 0,7 MWh t⁻¹ leche procesada en la producción de leche envasada como producto mayoritario (Giner-Santonja et al., 2019).

La industria láctea presenta elevados consumos de agua principalmente durante las etapas de lavado y desinfección de las diferentes etapas del proceso, así como de los medios de transporte de leche, generando aguas residuales con una importante presencia de contaminantes orgánicos, lo que resulta en relaciones C/N altas (Singh et al., 2019). La generación de aguas residuales dentro del sector varía fuertemente entre fábricas y está comprendida entre 0,3 y 12,6 m³ t⁻¹ de leche procesada (Giner-Santonja et al., 2019) aunque se sitúa habitualmente en torno a 3,5 m³ por tonelada de leche procesada, considerándose el principal impacto ambiental de este tipo de industrias. Esta elevada cantidad de producción de aguas residuales ha sido objeto de atención, debido a los impactos ambientales que genera y a la complejidad de su tratamiento (Liew et al., 2020).

Debido a la posible existencia de varias líneas de proceso, como pasteurización, coagulación o filtración, y de las operaciones de limpieza y desinfección realizadas en momentos puntuales, las concentraciones de los contaminantes presentan una variabilidad elevada (Rivas et al., 2010). Los efluentes líquidos de una industria láctea suelen tener un alto contenido en materia orgánica debido a la presencia de componentes de la leche, aceites y grasas, niveles elevados de nitrógeno y fósforo debido principalmente a productos de limpieza y desinfección, elevadas variaciones de pH por el uso de soluciones ácidas y básicas en limpiezas y conductividades elevadas. Entre los procesos de depuración existentes, el proceso comúnmente empleado para el tratamiento de aguas residuales en este tipo de industrias es un primer tratamiento fisicoquímico para eliminar gran parte de las grasas y materia

coloidal (Wang and Serventi, 2019), seguido de una proceso biológico basado en el proceso de lodos activos (Rivas et al., 2010), lo que implica la necesidad de eliminar, mediante procesos biológicos aeróbicos, la carga contaminante de las aguas residuales, generando en el tratamiento de las aguas residuales una cantidad relativamente alta de lodos y consumiendo una cantidad importante de energía eléctrica (Akansha et al., 2020; Wang and Serventi, 2019). Como alternativa a los procesos biológicos aerobios, en las últimas décadas se han implantado en el sector procesos anaerobios metanogénicos, que se consideran a día de hoy una alternativa factible para el tratamiento de aguas de la industria láctea, ya que permiten una reducción notable del consumo de energía y la generación de lodos en la EDAR industrial (Buntner et al., 2013; Passeggi et al., 2012). En este sentido, ya se han usado en el sector, de forma satisfactoria, sistemas anaerobios como reactores anaerobios UASB (Carvalho et al., 2013; Haugen et al., 2015).

Las tecnologías anaeróbicas se utilizan ampliamente, en países con climas templados y cálidos, para el tratamiento de aguas residuales municipales y a nivel global para el tratamiento de aguas industriales. Sin embargo, la huella ambiental de los tratamientos anaerobios, incluyendo aquellos ubicados en la industria láctea, podría verse incrementada por la presencia de metano disuelto en el efluente de los tratamientos anaerobios. El tratamiento anaeróbico produce metano, un gas de efecto invernadero (GEI) con un potencial de calentamiento de 28 para un horizonte temporal de 100 años. Una fracción del metano generado está presente disuelta en el efluente tratado, en equilibrio o sobresaturada con respecto a la fase de biogás generado (Souza et al., 2011). Para las aguas residuales de baja concentración, el metano disuelto podría representar hasta el 50% del metano total producido. El metano disuelto se desorbe fácilmente de los efluentes cuando se libera al medio ambiente o se trata posteriormente en biorreactores aeróbicos. No obstante, se ha propuesto el uso de metano disuelto como fuente de carbono para la desnitrificación biológica para reducir tanto las emisiones de gases de efecto invernadero como las concentraciones de nitrógeno en las aguas residuales tratadas. Esto podría lograrse utilizando dos vías biológicas aeróbicas o anóxicas diferentes. El proceso de oxidación anaeróbica del metano (n-damo) dependiente de nitrato/nitrato podría oxidar el metano y reducir los aniones de nitrógeno de forma anaeróbica, mientras que el proceso AMO oxida el metano aeróbicamente a productos de oxidación de metano, que podrían ser utilizados por microorganismos desnitrificantes heterótrofos (Sánchez et al. 2016).

En este capítulo se presenta la utilización de un prototipo del proceso SIAM, concebido en la Universidade de Santiago de Compostela (patente UE EP2952483A1), para el tratamiento “in situ” de aguas residuales generadas en una industria láctea. El proceso SIAM consiste en el tratamiento de aguas residuales mediante la combinación de un primer proceso biológico metanogénico UASB y un postratamiento mediante un biorreactor de membranas (MBR) (Sánchez et al., 2016) en el que se estimula el crecimiento de bacterias metanotróficas en la etapa MBR para la eliminación de metano disuelto presente en el efluente del UASB. La etapa MBR se compone de tres compartimentos: un primer compartimento anóxico, donde se oxida el metano disuelto para eliminar una fracción de los aniones de nitrógeno presentes en las aguas residuales; un segundo compartimento aeróbico y un tercer compartimento de filtración por membrana, donde el ion amonio se oxida a aniones de nitrógeno. Con ello se persigue reducir la emisión de GEI y la presencia de NT en el efluente, haciendo del SIAM un proceso amigable con el medio ambiente (Sánchez et al., 2016; Silva-Teira et al., 2017).

5.2 MATERIALES Y MÉTODOS

En este capítulo se ha operado un prototipo SIAM que se instaló en la factoría de productos lácteos, Capsa Foods, ubicada en Outeiro de Rei, Lugo, para tratar agua residual generada en dicha industria, dentro del proyecto Life-UE Siamec (<http://www.life-siamec.eu/>). Dicha agua residual se almacenaba previamente en una balsa de homogeneización de caudales, con objeto de reducir las puntas de caudal y carga contaminante y recibiera previamente un tratamiento de separación de flotantes y natas, mediante un sistema de flotación por aire cavitado (CAF). El prototipo experimental utilizado en este estudio se componía de las siguientes unidades principales: un tamiz rotatorio seguido de un decantador primario que tenían como cometido la separación de sólidos en suspensión y parte de las grasas que no se separaran en el CAF, un tanque de almacenamiento donde se introduce temporalmente el efluente del decantador para su alimentación a un reactor anaerobio UASB de 3,37 m³; un segundo tanque de almacenamiento del efluente del UASB para su alimentación a la unidad de postratamiento MBR de 2,06 m³ (Figura 5.1).



Figura 5.1. Izquierda: Fotografía del prototipo SIAM, en la que se pueden observar las unidades de pretratamiento y unidad UASB realizadas en acero inoxidable y contenedor que alberga al MBR y sistema Scada. Derecha: MBR previo a su llenado, situado en el interior del contenedor.

El reactor UASB tiene una altura total de 4280 mm, altura útil del reactor de 3819 mm y un diámetro interno de 1060 mm, siendo su volumen útil de 3,37 m³. La alimentación se introdujo a través de dos entradas enfrentadas, situadas en un punto próximo a la base del sistema. A lo largo del reactor se colocaron tomas de muestra laterales (puertos laterales) situadas a 700, 1.500, 2.300 y 3.100 mm de altura, que se utilizaron para monitorizar la presencia y concentración de lodo anaerobio. Las paredes externas del sistema UASB se han aislado con una capa de fibra de vidrio, con objeto de minimizar las pérdidas de calor, ya que el sistema se ha diseñado para operar a la temperatura del agua residual, por lo que no se controlará la temperatura de dicho reactor. La parte superior del UASB consta de un separador gas-sólido-líquido conformado por una campana de sección cónica invertida y con un rebosadero perimetral, donde se extrae el efluente tratado en esta unidad.

El sistema MBR estuvo compuesto por un primer compartimento anóxico de 1,37 m³, un segundo compartimento aerobio de 0,22 m³, y un último compartimento de filtración de 0,47 m³ en el que se ubicó una membrana de ultrafiltración. Se habilitaron 2 recirculaciones, una interna entre el compartimento de membrana y el aerobio, y una recirculación externa entre el compartimento aerobio y el anóxico. Se utilizó una membrana de ultrafiltración Bio-Cel, modelo XS-1 (Microdyn-Nadir, Alemania), con un área y un tamaño de poro respectivamente de 10 m² y 0,03 μm. El flujo medio de diseño recomendado por el fabricante es de 20 L m⁻² h⁻¹ por lo que el caudal a tratar en esta unidad podría llegar a los 200 L h⁻¹. La membrana se operó con ciclos de 7 minutos de permeación y 0,5 minutos de contralavado. En los compartimentos anóxico y aerobio se empleó el mismo soporte semiflexible poroso (Mutag Biochip, Multi Umwelttechnologie A.G., Alemania) descritos en el capítulo

4. El sistema MBR se puso en marcha con un volumen aparente de Biochip del 20% tanto en el compartimento aerobio como en el compartimento anóxico.

Se habilitó un sistema de registro de datos, control y supervisión (Scada) mediante acceso servidor web, que permitía monitorizar el sistema a distancia (Figura 5.2). En las líneas de alimentación al UASB y al postratamiento SIAM, así como en la recirculación externa y permeado del MBR, se instalaron caudalímetros para conocer los caudales, en la línea de recirculación interna del MBR se instaló un rotámetro. Se instalaron sensores de nivel en todos los compartimentos del sistema MBR, así como en el reactor UASB y los dos tanques de laminación. Hay que señalar que el reactor MBR, el cuadro eléctrico de la planta y el ordenador con sistema Scada se ubican dentro de un contenedor de transporte marítimo dotado de ventilación (Figura 5.1).

En cuanto a la capacidad de tratamiento el sistema de pretratamiento y tratamiento primario, formado por el tamiz rotatorio y decantador se ha diseñado para tratar un caudal de tratamiento de 600 L h^{-1} , superior a la que posteriormente usará para alimentar a la etapa UASB del proceso SIAM, diseñado para tratar 400 L h^{-1} o al postratamiento MBR, que recibe un caudal de 185 L h^{-1} . El objetivo de dicha estrategia de alimentación ha sido que las unidades situadas aguas arriba nunca limitasen la operación, desde el punto de vista hidráulico, de las siguientes unidades de tratamiento, de forma que los excesos se devolviesen a la salida del sistema CAF para su tratamiento en el sistema de lodos activos que posee dicha factoría.

Se analizaron muestras de agua pretratada alimentada al UASB, efluente del reactor UASB, y muestras de agua del MBR de postratamiento tomadas en los compartimentos anóxico y aerobio, así como en el permeado final. Se analizaron los siguientes parámetros DQO, DBO₅, COT, amonio, nitrito, nitrato, NT, fósforo, alcalinidad, SST y SSV, conductividad y ácidos grasos volátiles AGV, utilizando los métodos analíticos descritos en el Capítulo 2 de esta tesis.

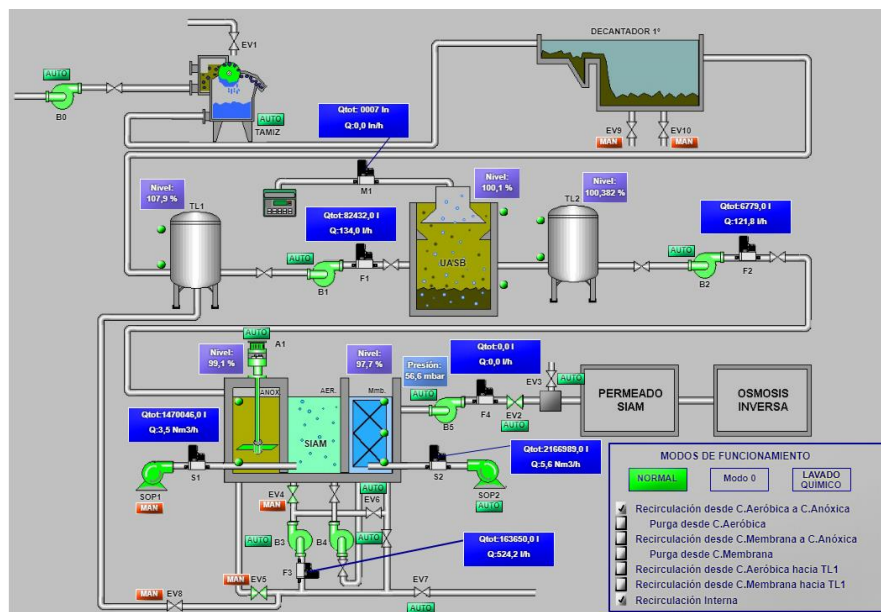


Figura 5.2. Imagen del diagrama de flujo del sistema Scada donde se puede apreciar el tamiz rotatorio, decantador primario, primer tanque de laminación (TL1), reactor UASB, segundo tanque de laminación (TL2) y reactor MBR con tanque de almacenamiento de permeado. Se observan, asimismo, las señales que se adquirieron desde sensores de nivel o presión y caudalímetros instalados.

Como etapa final, los últimos días de operación del prototipo se operó una unidad de filtración por membrana de ósmosis inversa (OI) a la que se alimentó el permeado del postratamiento SIAM. La unidad operada fue una Petsea RO® Planta Purificadora D51, proporcionada por la empresa Peter Taboada (Redondela, Pontevedra). Esta unidad tiene un caudal de diseño de alimentación de 110 L h^{-1} para una temperatura de operación de 18°C , y un caudal de diseño de agua producida de 70 L h^{-1} .

5.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.3.1 Resultados de la etapa metanogénica UASB

El agua residual alimentada al prototipo SIAM se tomó después del pretratamiento realizado por la propia factoría en su estación depuradora de aguas residuales (EDARi) industriales, que constaba de un tanque de homogeneización, sistema de ajuste de pH mediante adición de CO_2 y un dispositivo de flotación por

EVALUACIÓN DE LA TECNOLOGÍA SIAM PARA EL TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES DE LA INDUSTRIA LÁCTEA

aire cavitado (CAF). El pretratamiento de aguas con contenido en grasa está altamente recomendado cuando se operan sistemas UASB, especialmente a temperaturas bajas (Van Lier et al., 2010). La Tabla 5.1 muestra las características del agua alimentada al UASB en cuanto a promedios de los diversos parámetros analizados y desviaciones típicas, que presentaron una alta variabilidad en términos de concentración de DQO y temperatura, así como de nitrógeno.

Tabla 5.1. Características del agua residual alimentada al UASB.

Parámetros	Mínimo-Máximo	Promedio	Desviación
DQO _T (mg L ⁻¹)	191-4024	1421	690
DQO _S (mg L ⁻¹)	61-2332	626	364
DBO ₅ (mg L ⁻¹)	50-2290	740	467
NT (mg L ⁻¹)	17-146	66	21
SST (mg L ⁻¹)	70-1700	700	410
SSV (mg L ⁻¹)	70-1620	550	370
PT (mg L ⁻¹)	6-67	25	11
DQO/N	8-47	23	7
pH	6.1-9.0	7,4	0.6
T (°C)	14-36	27	5

La unidad UASB se operó durante 530 días. La operación del UASB se puede dividir en 3 períodos (Figura 5.3): Período 1, desde el día 1 hasta el día 80; Período 2, desde el día 81 hasta el día 283; y Período 3, desde el día 284 hasta el día 530 de operación. En el Período 1, en el que se realizó el arranque del reactor, el UASB se inoculó con 400 L de biomasa floculenta anaerobia procedente de un digestor de mezcla completa de una EDAR urbana. Para evitar la pérdida de biomasa debido a las malas propiedades de sedimentación que presentaba, el reactor se alimentó en discontinuo, con un TRH estimado en 26 h. Esa estrategia no funcionó, lavándose gran parte de la biomasa del sistema en menos de 6 de operación. Debido a ello, en el primer día de operación del Período 2 (día 81) el reactor UASB se reinoculó empleando biomasa granular anaerobia procedente de otra industria del sector alimentario, lo que permitió un segundo arranque más rápido, obteniendo eliminaciones de DQO buenas desde el inicio del Período 2. La media de eliminación de DQO en este período fue del $62,5 \pm 16,4\%$. El TRH aplicado varió desde 9 a 26 horas. Los valores más elevados se observaron durante el arranque de la unidad UASB debido a la alimentación de bajos caudales en discontinuo, disminuyendo a una media de $11,0 \pm 1,5 \text{ h}^{-1}$ tras la puesta en marcha.

Durante los primeros 192 d de operación prácticamente no se detecta una cantidad significativa lodo en las tomas laterales del reactor y posiblemente la eliminación de materia orgánica observada en el sistema, fuera causada por la presencia de lodo en el fondo del reactor. Por ello, se procedió a inocular el UASB con una cantidad limitada de lodo granular en el día de operación 124 y posteriormente, en el día de operación 188 con 300 L de biomasa granular anaerobia, procedente de los reactores UASB de los dos prototipos SIAM y SIAL de los laboratorios de la USC. La inoculación del día 124 no causó ningún impacto en el nivel de SST o SSV de la toma lateral 1, debido quizás al pequeño volumen de lodo utilizado, pero la efectuada en el día de operación 188 se tradujo en la rápida detección de lodo en la toma lateral 1, situándose a partir de ese momento entre los 15 y 35 g SST L⁻¹ (Figura 5.4). La concentración de SST y SSV en los puntos de muestreo superiores, Puertos 2, 3 y 4, fue muy baja o incluso próxima a cero. Ello no significa que no se acumulase biomasa en el reactor, pero de hacerlo fue poco significativa, por lo que el nivel del manto de sólidos dentro del sistema se situaría entre las tomas de muestra 1 y 2. En todo caso, prácticamente todo el lodo generado se pudo lavar con el efluente del UASB y los resultados ponen de manifiesto que no se debería usar lodo anaerobio de digestores de lodos, como inóculo de UASB industriales.

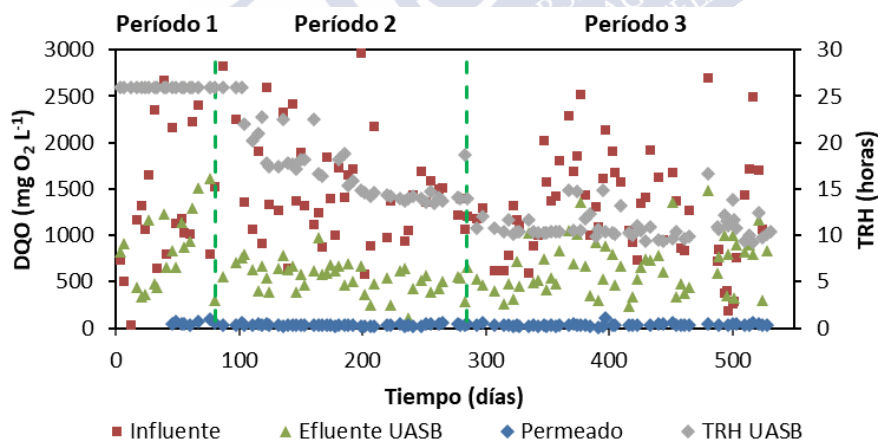


Figura 5.3. Evolución de la DQO total en el influente, efluente del sistema UASB y permeado del sistema SIAM (eje principal), y del TRH con el que operó la unidad UASB (eje secundario).

El promedio de la concentración de sólidos totales, calculado para todo el volumen del reactor UASB se estimó en $9,7 \pm 1,7$ g L⁻¹. La velocidad aparente de eliminación de materia orgánica calculada para la etapa del UASB fue de $0,16 \pm 0,09$

EVALUACIÓN DE LA TECNOLOGÍA SIAM PARA EL TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES DE LA INDUSTRIA LÁCTEA

g DQO g^{-1} ST d^{-1} . Este valor está en el rango de las velocidades de eliminación orgánica obtenidas en ensayos en discontinuo de actividad metanogénica específica realizados durante los días de operación 214 y 375, donde se observó un incremento de la misma de 0,10 a 0,21 g DQO g^{-1} ST d^{-1} . Este valor es similar al obtenido por Elmitwalli y Otterpohl (2007) tratando aguas grises, o por Seghezze et al. (2002) tras un año de operación de un UASB con una concentración media de 30 g SSV L^{-1} .

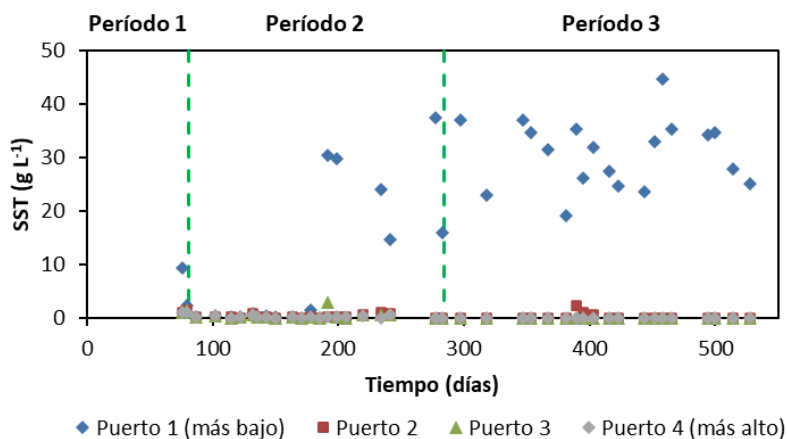


Figura 5.4. Perfil de sólidos en los diversos puertos laterales del reactor UASB.

Además de la dificultad para operar con una cantidad limitada de lodo, otro de los retos planteados con el presente proyecto fue la de operar el sistema UASB sin ningún sistema de regulación de temperatura, operando el sistema a una temperatura próxima a la que llegase el agua residual alimentada. La temperatura de operación del UASB varió entre 15 y 36 °C, no observando la existencia de gradientes de temperatura dentro del reactor UASB. La temperatura ambiental varió desde -2 °C hasta +33 °C, Las paredes del reactor UASB estaban dotadas de una capa de fibra de vidrio como material aislante, para prevenir la pérdida de calor debido a las condiciones ambientales. La temperatura del agua residual alimentada al UASB disminuyó entre 1 y 4 °C dentro del reactor en las épocas más cálidas del año y en torno a 4 y 8 °C durante el invierno, debido a las pérdidas de calor a través de las paredes del reactor UASB. A pesar de las variaciones, no se observó ningún impacto de la temperatura, en la eliminación de materia orgánica del UASB (Figura 5.5).

El indicador principal de rendimiento de esta etapa fue la evolución de la DQO de entrada y salida. Debido a la alta variabilidad en la DQO alimentada y cambios de

TRH en los Períodos 2 y 3, el parámetro que define el comportamiento del reactor UASB es la velocidad volumétrica de eliminación de materia orgánica (ORR). La Figura 5.6 muestra las ORR observadas durante la operación del UASB, que variaron entre 0 y 3 kg DQO m⁻³ d⁻¹.

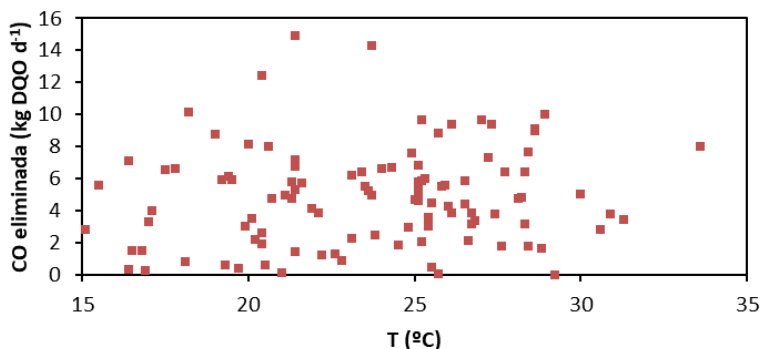


Figura 5.5. Eliminación de DQO total observada frente a la temperatura de operación del UASB.

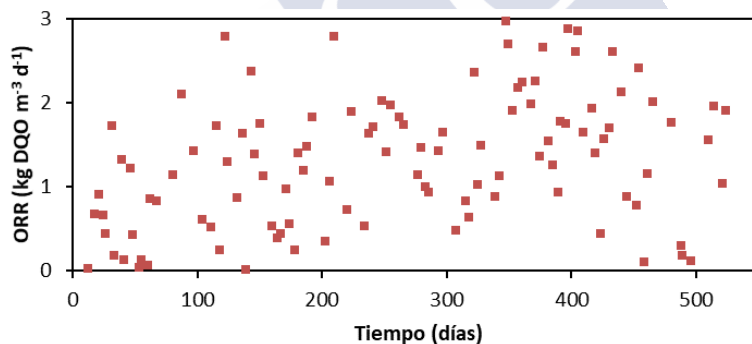


Figura 5.6. Evolución de la velocidad volumétrica de eliminación de materia orgánica (ORR) observada en el UASB.

Durante toda la operación del UASB se observó la presencia tanto de biomasa en suspensión como granular en el efluente en concentraciones variables (18-600 mg SST L⁻¹) hecho también observado en otras investigaciones (Gomes et al., 2011; Miranda et al., 2006). Una fracción de esta biomasa granular y floculenta que se arrastraba con el agua ascendente en el UASB flotaba, acumulándose en la superficie del separador de 3 fases, por lo que fue preciso su eliminación de forma manual. La pérdida de biomasa se produjo posiblemente debido a la presencia de grasas en la alimentación, que producían el arrastre de parte de los SST (Hwu et al., 1998; Passeggi

et al., 2012) o a las oscilaciones térmicas a las que se sometió el reactor, ya que se observó que los incrementos de temperatura en sistemas anaerobios aumentan la presencia de SST en el efluente (Ahn and Forster, 2002), ya que la entrada de agua más caliente podría causar corrientes térmicas ascendentes dentro del sistema. Desde el inicio de la operación hasta el día 300, la relación DQO_T/DBO_5 fue de 1,4-2,0 g $DQO\ g^{-1}\ DBO_5$. Desde el día 301 en adelante, prácticamente todo el Período 3, el valor de esa relación subió a valores de 2,5-20 g $DQO\ g^{-1}\ DBO_5$, lo que indica un descenso significativo en la biodegradabilidad del agua residual. El motivo de dicho cambio se puede encontrar en una remodelación a la que sometió la EDAR industrial, ya que se construyó un nuevo tanque de homogeneización más voluminoso, por lo que el TRH al que se sometía el agua residual bruta se incrementó, lo cual pudo incentivar procesos de biodegradación en el propio tanque de homogeneización. Ésta podría ser la razón de la subida observada en la relación DQO/DBO_5 , de hecho, en varios de las analíticas de DBO_5 , no se detectó señal de consumo tras haber pasado varios días desde el inicio del ensayo. Estos factores se presuponen como los responsables de la caída de eficacia de eliminación de DQO en el sistema UASB durante el Período 3, que fue del $52,3 \pm 16,8\%$ (Figura 5.4).

Tal como se señaló previamente no se encontró relación entre la temperatura y la eliminación de DQO (Figura 5.5). Para analizar el impacto de la temperatura en la eliminación de DQO , se deben considerar otros indicadores. Uno de ellos es la producción volumétrica de metano en el biogás (Figura 5.7). En este sentido, se pudo observar cierta dependencia de la producción de metano con la temperatura, incrementándose la velocidad de producción de metano especialmente por encima de $25\ ^\circ C$, señalando que por encima de esta temperatura se potencia la biometanización de la materia orgánica. Se debe señalar que se observaron varios puntos a temperaturas elevadas donde la producción de metano fue baja, lo que indica que la biometanización en el sistema estaría influenciado por la temperatura, pero también por otros factores, como puede ser la baja biodegradabilidad que puede presentar en ciertos momentos el agua residual alimentada, especialmente cuando la presencia de DQO es baja.

Para comprobar el impacto de la biodegradabilidad en la eliminación de DQO , se evaluó la relación existente entre la velocidad de carga orgánica (VCO) aplicada al UASB y la velocidad volumétrica de eliminación de materia orgánica (ORR), observando una tendencia lineal que no se corta en el origen de la gráfica (Figura 5.8). Esa tendencia indica que la velocidad volumétrica de eliminación de materia orgánica

se incrementa cuando lo hace la velocidad de carga orgánica, a partir de cierto valor umbral, a VCO aplicadas inferiores a $0,63 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$, el sistema no eliminaría materia orgánica del agua residual, correspondiendo parte de estos puntos a momentos en los que DQO alimentada era baja, lo que pone de manifiesto la existencia de una fracción de materia orgánica no metanizable. Se observó en todo caso, la misma tendencia entre la producción de metano y la velocidad de carga orgánica.

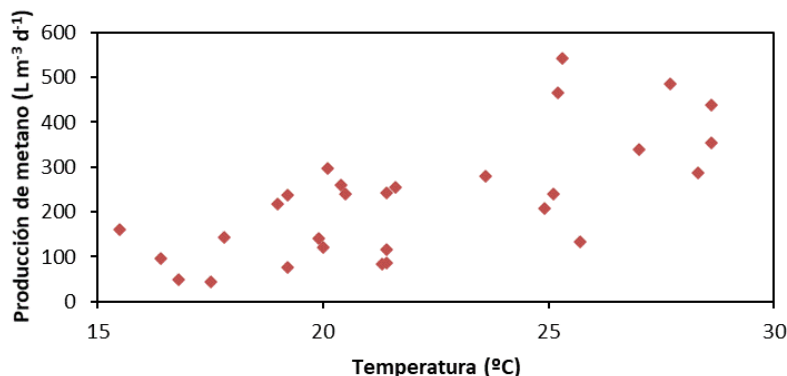


Figura 5.7. Relación entre la producción de biogás y la temperatura en el reactor UASB.

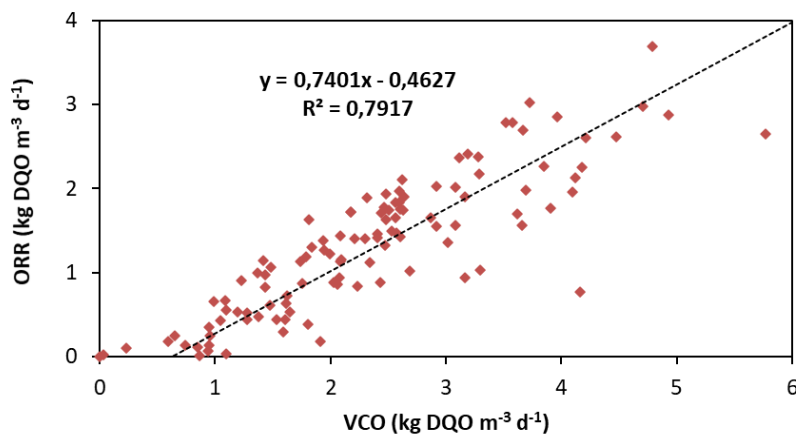


Figura 5.8. Relación entre los parámetros VCO y ORR en el reactor UASB.

Desde el arranque de la unidad UASB hasta el día de operación 220 (Período 1 y parte del Período 2), la composición de metano en el biogás fue del 70-80% y el pH fue mayor a 7. Desde el día 221 hasta el día 318, últimos días del período 2 y primeros

EVALUACIÓN DE LA TECNOLOGÍA SIAM PARA EL TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES DE LA INDUSTRIA LÁCTEA

del período 3, la composición de metano baja hasta un 55-65%, observando al mismo tiempo, un incremento en la composición de CO₂ que se incrementó desde un 10% hasta un 20-30% junto a un descenso en el pH en el reactor UASB, con valores entre 6,4 y 6,6. Esa bajada de pH estuvo relacionada con la bajada de pH del agua residual de entrada, causado seguramente por la degradación de materia orgánica en el tanque de homogeneización industrial, por lo que a partir del día de operación 319 el pH se controló mediante la adición de sosa en la alimentación del UASB, manteniendo el pH en el mismo entre 6,8 y 7,4. A partir de este día, la composición de metano en el biogás se mantuvo en el 60-80% (Figura 5.9).

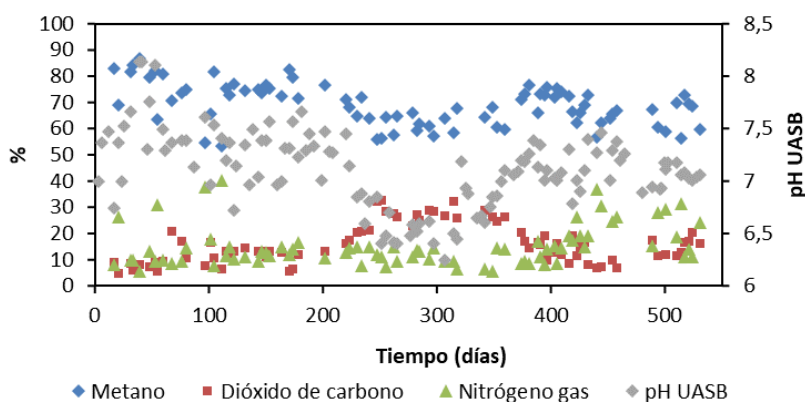


Figura 5.9. Composición del biogás generado en el UASB.

5.3.2 Eliminación de nutrientes y eficacia del postratamiento MBR

El postratamiento SIAM se alimentó con el efluente del UASB a partir del día de operación 19 y se operó hasta el día 530, con una media de DQO de 650 ± 291 mg DQO L⁻¹, amonio de $29,5 \pm 13,7$ mg NH₄⁺-N L⁻¹, NT de $53,8 \pm 20,9$ mg NT L⁻¹, y PT $20,2 \pm 6,9$ mg PT L⁻¹. La relación media DQO:NT:PT fue de 100:8,3:3,1 g g⁻¹. Al inicio de la operación, el postratamiento se alimentó con un caudal de 100 L h⁻¹. A partir del día 237, ese caudal se aumentó a 185 ± 4 L h⁻¹. El tiempo de retención hidráulico varió entre 13,5 y 24,3 h. A partir del día 237 se situó en $15,0 \pm 1,0$ h. Se aplicó una relación de recirculación externa de $3,5 \pm 0,6$ y recirculación interna comprendida entre 2 y 3. En cuanto al pH del permeado del MBR se situó en $8,0 \pm 0,3$, siendo estos valores superiores a los observados en el efluente del UASB ($7,1 \pm 0,4$). La temperatura media del agua disminuyó desde los $23,5 \pm 4,0$ °C observados en el efluente del UASB, hasta los $19,1 \pm 4,5$ °C dentro del MBR.

Se debe señalar que la presencia de la membrana en el proceso SIAM aseguró la ausencia de sólidos en suspensión en el permeado. La eliminación de DQO en el postratamiento se situó por encima del 95% durante toda la operación, con un promedio del $97 \pm 2\%$. Los valores de DQO en el efluente de SIAM variaron desde 10 hasta 69 mg DQO L⁻¹.

En la figura 5.10 se muestra la evolución de PT determinado en el agua residual alimentada tanto al UASB, como al MBR (efluente de UASB) y en el permeado del sistema SIAM. A pesar de que el fósforo no es un compuesto objetivo para la tecnología SIAM, se constató una eliminación media del 43% de PT alimentado, observando la eliminación de este nutriente tanto en el sistema UASB, 17% de eliminación, como en el MBR, 26% de eliminación. Aunque en la etapa UASB no se esperaba la eliminación de PT, se observó que para aquellas muestras de alimentación que contenían más de 30 mg P L⁻¹, su concentración se limitaba en el efluente del UASB a menos de 30 mg L⁻¹, produciéndose una eliminación de parte del fósforo (Figura 5.10). Se observa que para aguas alimentadas con PT comprendido entre 12 y 29 mg L⁻¹ se puede producir tanto eliminación como un aumento de este nutriente en el efluente y entre 5 y 12 mg L⁻¹ incluso la redisolución del precipitado, aunque el pequeño número de puntos no permite el extraer una conclusión clara (Figura 5.11). Esto podría deberse a la precipitación o de redisolución de fosfatos de calcio o con menos probabilidad de estruvita, durante el tratamiento anaerobio de las aguas, de hecho, la concentración de Ca y Mg se midió puntualmente en el agua alimentada, estando comprendida en 35-45 mg Ca L⁻¹ y 4-5 mg Mg L⁻¹ y análisis puntuales de lodo anaerobio, señalaban la presencia de 30% de este elemento en el residuo seco.

La precipitación de fosfato de calcio en el MBR podría ser, junto con la asimilación biológica incentivada por microorganismos acumuladores de P, los mecanismos que explicasen la eliminación de P observado en dicho sistema de postratamiento. La relación DBO₅/PT determinada en el agua alimentada al MBR, de 19 g g⁻¹ se encuentran muy próximas a la de 20 g g⁻¹ señalada en la bibliografía (Metcalf&Eddy et al., 2014) además la cámara anóxica mantuvo siempre un potencial redox anaerobio de -352 ± 53 mV, con agotamiento de aniones de nitrógeno y un tiempo de contacto de $3 \pm 1,8$ h, superior al recomendado de 1 h, lo que propiciaría el desarrollo de organismos acumuladores de fósforo. Se debe señalar que el Ca observado en el permeado se encontraba en niveles similares a los observados en el sistema UASB, y que la presencia de Ca en lodo del MBR fue del 13%. La concentración de PT en el efluente, con un promedio de $14,2 \pm 6,7$ mg P L⁻¹ está

EVALUACIÓN DE LA TECNOLOGÍA SIAM PARA EL TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES DE LA INDUSTRIA LÁCTEA

habitualmente por encima del límite de descarga que figura en la autorización ambiental integrada de la planta, de 10 mg P L^{-1} , por lo que sería recomendable el reducir dicha concentración mediante la optimización de la operación del sistema para la eliminación de PT o en su defecto mediante precipitación química.

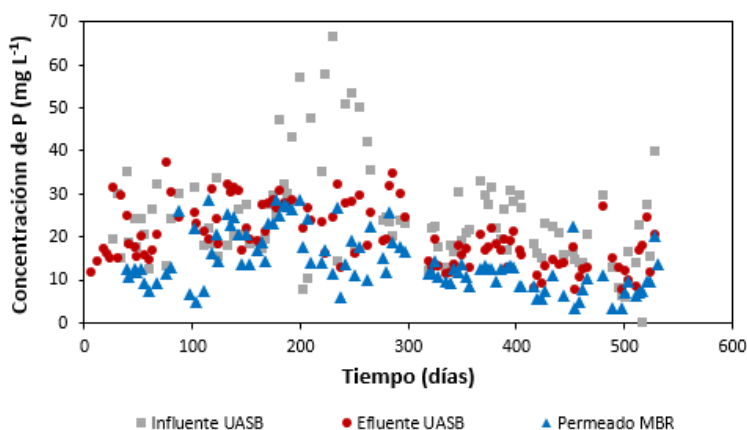


Figura 5.10. Fósforo total alimentado al sistema UASB, alimentado al MBR desde el UASB y presente en el permeado del sistema SIAM.

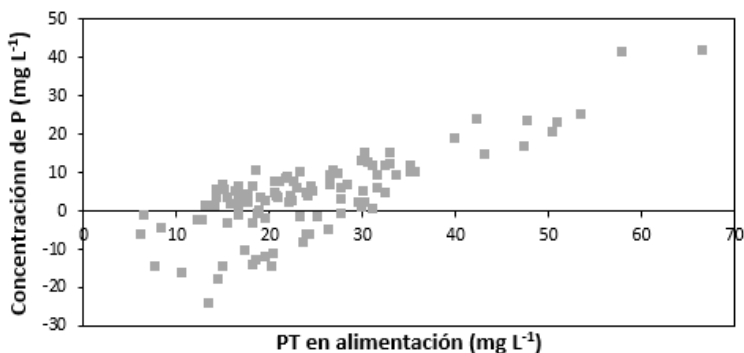


Figura 5.11. Fósforo total eliminado en el reactor UASB frente a la concentración de PT observada en la alimentación.

Respecto a compuestos de nitrógeno, se debe señalar la alta variabilidad observada en la concentración de este componente en el agua alimentada al sistema SIAM, siendo la concentraciones medias y desviación típica de $67,3 \pm 29,4 \text{ mg NT L}^{-1}$. El efluente del tratamiento UASB presenta concentraciones inferiores de $53,9 \pm 20,7 \text{ mg NT L}^{-1}$, quizás debido a que no se computase el NT asociado con los sólidos

flotantes que se purgaban de forma manual o a parte que se acumularía dentro del reactor en forma de lodo. En cuanto al NT observado en el permeado final del sistema SIAM se observó una concentración de $13,7 \pm 6,7 \text{ mg NT L}^{-1}$ (Figura 5.12). Las velocidades de desnitrificación obtenidas en el postratamiento variaron entre 30 y $160 \text{ mg N L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, con un promedio de $80 \pm 30 \text{ mg N L}^{-1} \text{ d}^{-1}$.

El efluente del UASB contuvo amonio y una fracción de nitrógeno orgánico, seguramente de origen proteico, no hidrolizado en la etapa UASB, tras este tratamiento alrededor del 54% del NT se encontraba hidrolizado en forma de amonio. La concentración de ion amonio en el permeado fue inferior de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ durante casi todo el período de operación, lo que el sistema de postratamiento MBR mostró un comportamiento estable y robusto a la hora de nitrificar este compuesto. En ese sentido, la concentración de oxígeno disuelto en la cámara aerobia del sistema MBR fue de $3,1 \pm 2,0 \text{ mg L}^{-1}$, siendo casi siempre superior a 1 mg L^{-1} de O_2 .

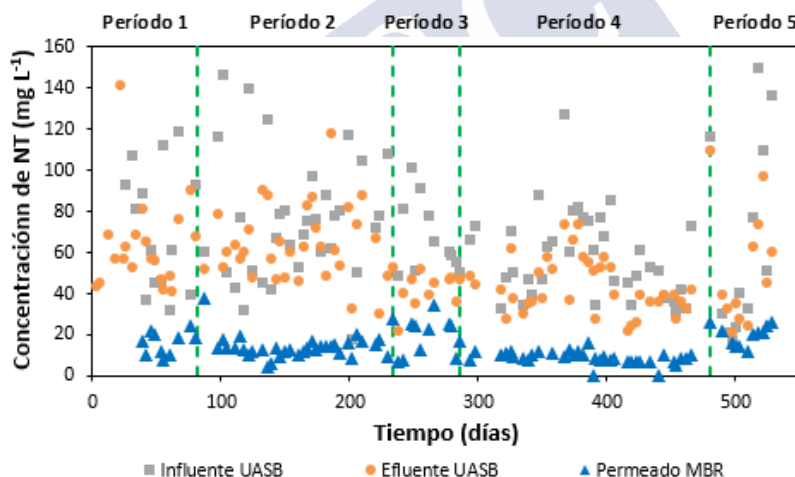


Figura 5.12. Nitrógeno total alimentado al sistema UASB, alimentado al MBR desde el UASB y presente en el permeado del sistema SIAM.

Durante la operación del postratamiento SIAM se pueden diferenciar 5 períodos diferentes: Período 1 (días de operación 19-80), desde la puesta en marcha hasta alcanzar la nitrificación completa; Período 2 (días de operación 81-233), donde se alcanzó una eliminación media de NT del 79% con velocidades de carga de nitrógeno total elevadas; Período 3 (días de operación 234-285), donde no se alcanzó la nitrificación total y la eliminación de NT descendió a un 54%; Período 4 (días de

EVALUACIÓN DE LA TECNOLOGÍA SIAM PARA EL TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES DE LA INDUSTRIA LÁCTEA

operación 286-479), donde se alcanzó nuevamente la nitrificación total con una media de eliminación de NT del 77% aplicando velocidades de carga de NT menores que en el Período 2; Período 5 (días de operación 480-531), donde se aplicaron una relación de recirculación baja ($R=2$) y concentraciones de nitrógeno en alimentación superiores, estando el amonio presente en el permeado de SIAM y disminuyendo la eliminación de NT hasta un 52% (Figura 5.12).

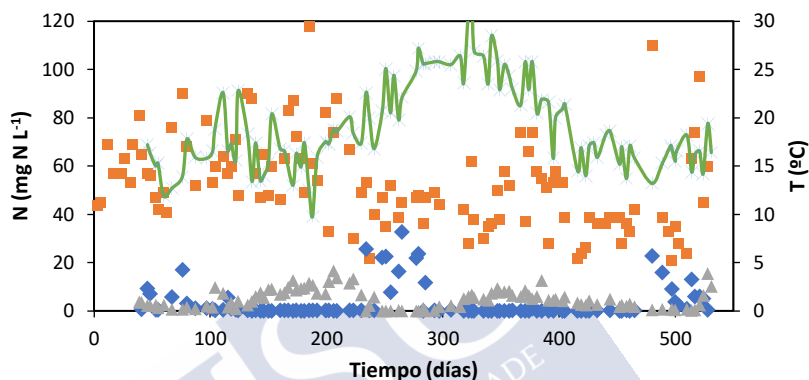


Figura 5.13. Evolución del NT alimentado al MBR (naranja); amonio (azul) y nitrato (gris) en permeado; y temperatura en el compartimento aerobio (verde).

La pérdida de nitrificación observada en el Período 2 (Figura 5.13) está asociada con un incremento de SST a valores mayores de 14 g L^{-1} (Figura 5.14), concentración que redujo la transferencia de oxígeno en el biorreactor, aumentando el consumo de oxígeno asociado a decaimiento celular y disminuyendo la transferencia de oxígeno (Capodici et al., 2019); en el Período 5 la pérdida de la nitrificación se explica por la combinación de fallos operacionales en el sistema y valores de NT más elevados con respecto a días anteriores, incrementándose dicho parámetro de 40 a 110 mg L^{-1} .

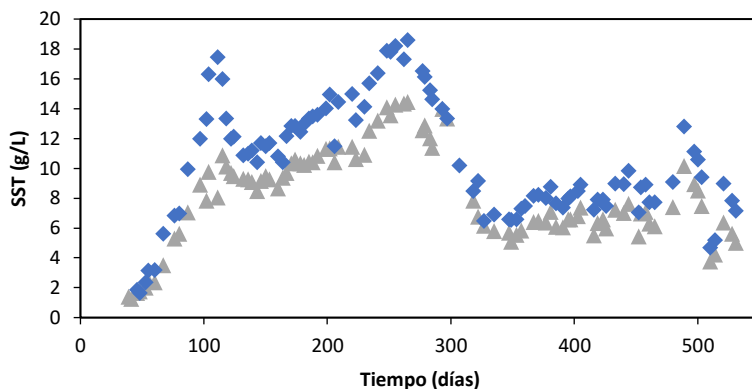


Figura 5.14. Evolución de la concentración de sólidos en los compartimentos anóxico (gris) y aerobio (azul) del postratamiento MBR.

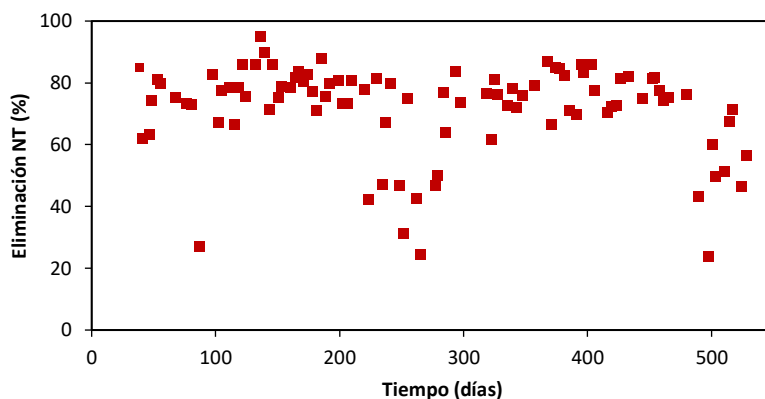


Figura 5.15. Eliminación de NT observada en el postratamiento SIAM.

El postratamiento fue capaz no solo de reducir casi el 80% del NT de entrada (Figura 5.15), sino que también obtuvo un efluente de alta calidad en términos de NT. Tras el arranque de SIAM, exceptuando los Períodos 3 y 5 de pérdida de nitrificación, el permeado presentó unos valores de nitrógeno total menores al límite de vertido de la autorización ambiental integrada de la planta, 20 mg L^{-1} . El efluente final del proceso SIAM, permeado del MBR, presentó un NT medio de $13,0 \pm 3,5$ y $9,2 \pm 2,2 \text{ mg NT L}^{-1}$ en los Períodos 2 y 4, respectivamente. Desde el día 390 hasta el día 465

EVALUACIÓN DE LA TECNOLOGÍA SIAM PARA EL TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES DE LA INDUSTRIA LÁCTEA

del Período 4, el sistema SIAM alcanzó valores de concentración de NT en permeado menores a 10 mg L^{-1} , con una media de $7,8 \pm 1,4 \text{ mg NT L}^{-1}$ (Figura 5.12).

El rendimiento celular aparente en el postratamiento MBR fue de $0,26 \text{ g SST g}^{-1} \text{ DQO}$ eliminada en esta etapa. Este valor fue similar a otros observados para procesos de lodos activos, que pueden variar entre $0,2$ y $0,45 \text{ g ST g}^{-1} \text{ DQO}$ eliminada (Habermacher et al., 2015). En todo caso, se debe considerar que los sólidos que abandonan el sistema UASB se retienen totalmente mediante tratamiento en la unidad MBR, por ello, el rendimiento celular aparente del proceso global SIAM fue mucho menor, en torno a $0,11 \text{ g SST g}^{-1} \text{ DQO}$ eliminada, siendo muy similar al observado para procesos anaerobios metanogénicos (van Haandel and G. Lettinga, 1994). Por ello, el proceso SIAM podría disminuir en torno a un 60% la generación de biomasa con respecto a un sistema convencional de lodos activos.

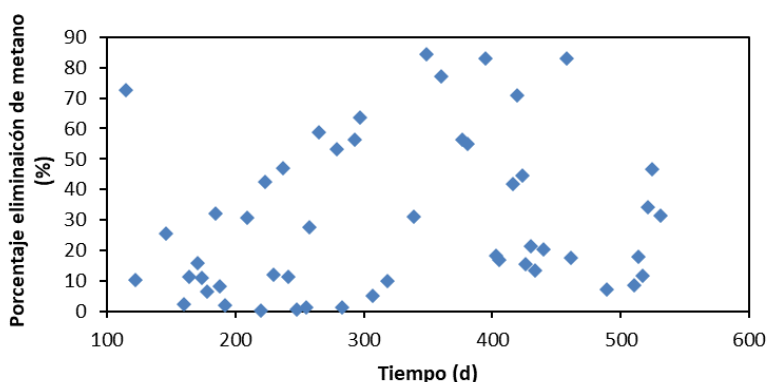


Figura 5.16. Eliminación de metano disuelto observada en la cámara anóxica del MBR.

La eliminación de metano disuelto en la cámara anóxica fue tan solo del $25 \pm 25\%$, observándose una amplia dispersión de valores de la eliminación de metano, que pueden ir desde valores inapreciables de eliminación, hasta valores superiores al 50% ya observados en la experimentación en los prototipos SIAM de laboratorio (Arias et al., 2018; Silva-Teira et al., 2017). No se ha estimado la eliminación de metano en cámara aerobia, que podría incrementar estos valores llegando incluso a duplicarla (Arias et al., 2018). Esta oxidación de metano puede imputarse a la presencia de metanótrofos aerobios, detectados en muy bajas abundancias mediante sondas FISH, no habiendo detectado oxidadores anaerobios de metano. Este resultado se atribuye a la presencia de una concentración de DQO elevada a la entrada del compartimento

anóxico del postratamiento SIAM, donde la presencia de DQO como fuente de carbono en exceso podría dificultar el crecimiento de microorganismos que empleen metano, como son los oxidadores aerobios y anaerobios de metano. En un estudio de modelado del proceso SIAM (Liñares, 2018), en el que se calibró el modelo con datos experimentales de un prototipo SIAM gemelo al utilizado en este estudio, pero que se operó en una EDAR municipal en Cartagena, se observó que la velocidad de eliminación de metano, en el compartimento anóxico del MBR, se veía reducido notablemente en aquellos escenarios en los que se incrementaba la presencia de materia orgánica disponible, en el agua residual alimentada y que la eliminación de metano disuelto mejoraba al reducirse el contenido de materia orgánica alimentado. En dicho estudio se determinó que en la cámara aerobia del MBR se fomentaría la oxidación de metano bajo concentraciones de oxígeno disuelto comprendidas entre 0,2 y 1 mg L⁻¹.

La eliminación de NT en el MBR no estuvo limitada por materia orgánica. De hecho las relaciones DQO:NT y DBO₅:NT observada en el efluente del UASB alimentado al MBR eran respectivamente de 12,1 g g⁻¹ y 7,2 g g⁻¹, superiores en todo caso a la de 5 g DQO g⁻¹ de N recomendada en la bibliografía (Metcalf&Eddy et al., 2014). Por otro lado, tanto el contenido de nitrato observado en la cámara anóxica como, con un promedio 0,3 mg N L⁻¹, como el muy bajo potencial redox observado, -352 mV, parecen corroborar la limitación por nitrato en cámara anóxica. Además, las velocidades de eliminación de DQO en el postratamiento fueron de $2,1 \pm 0,9$ g DQO L⁻¹ d⁻¹ podrían justificar la eliminación de 422 mg N L⁻¹ d⁻¹, valor mucho mayor al observado durante la operación y que una fracción de la DQO tuviera que oxidarse en las cámaras con aireación del sistema. Por tanto, se podrían haber alcanzado velocidades de eliminación de nitrógeno superiores si se trabajase con relaciones de recirculación más elevadas a las de 3:1 durante casi todo el período experimental, pudiendo reducir aún más el valor de NT observado en el permeado del postratamiento MBR.

Se realizaron ensayos de actividad desnitrificante en discontinuo en los días de operación 421 y 521. Los resultados indicaron que la desnitrificación se llevó a cabo principalmente por desnitrificantes heterótrofos (89%), y una pequeña fracción del nitrógeno podría eliminarse empleando productos de decaimiento de la biomasa y de la oxidación aerobia del metano (11%), sin detectarse señal de actividad de la oxidación anaerobia de metano (Figura 5.17). Además, la contribución de la biopelícula anóxica a la desnitrificación no fue significativa, solo un 7% frente a la

EVALUACIÓN DE LA TECNOLOGÍA SIAM PARA EL TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES DE LA INDUSTRIA LÁCTEA

biomasa floculenta (93%), por lo que no se logró el objetivo de fijar biomasa activa en la biopelícula anóxica. Se cree que la razón podría radicar una vez más, en la elevada concentración de DQO de entrada al compartimento anóxico, donde la biomasa floculenta fue capaz de desnitrificar todo el nitrato presente usando DQO biodegradable. El potencial de desnitrificación global obtenido en los ensayos en discontinuo fue de $900 \text{ mg N L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, mayores a los obtenidos experimentalmente en el prototipo SIAM, poniendo de manifiesto la limitación de la desnitrificación en el compartimento anóxico por el déficit de nitrato que se observó durante toda la experimentación.

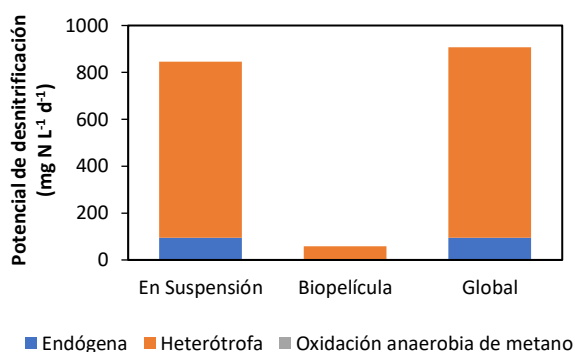


Figura 5.17. Potencial de desnitrificación determinado en discontinuo, para la biomasa en suspensión y la biopelícula anóxica del MBR.

Se realizaron ensayos en discontinuo de nitrificación en los días 214 y 423 para evaluar el potencial de nitrificación tanto de la biomasa floculenta como de la biopelícula, controlando la aireación. Se observó que la biopelícula representó el 17% de potencial de nitrificación global. El potencial de nitrificación obtenido para la biopelícula fue de $40 \text{ mg N L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, frente a los $200 \text{ mg N L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ (Figura 5.18). La contribución de la biopelícula fue moderada debido a que el MBR se operó con una concentración de SSV elevada, comprendida entre 7 y 10 g SSV L^{-1} .

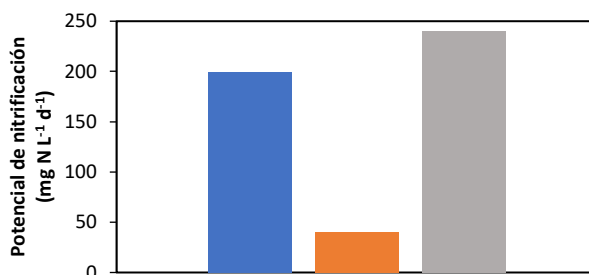


Figura 5.18. Potencial de nitrificación de la biomasa en suspensión (azul) y la biopelícula aerobia (naranja) frente a la suma de ambos (gris).

5.3.3 Comportamiento de la membrana de ultrafiltración del MBR y ensayos de ósmosis inversa

Se monitorizó el comportamiento de los parámetros habituales de seguimiento de membranas como presión transmembrana (PTM) temperatura (T) permeabilidad y flujo por medio del sistema SCADA. En cuanto al comportamiento de la membrana, ésta alcanzó flujos altos durante toda la operación, que se mantuvieron en $18\text{--}19 \text{ L m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ tras el día de operación 171 (Figura 5.19) valores similares a los $20 \text{ L m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ observados en sistemas MBR tratando agua residual urbana (Judd, 2002). Se realizaron 5 operaciones de limpiezas de mantenimiento, sin observarse la necesidad de realizar mantenimientos intensivos con productos químicos hasta los últimos días de operación, que no se realizaron. La primera limpieza de mantenimiento se realizó en el día de operación 248. El ensuciamiento de la membrana se puede atribuir a la elevada concentración de SST con la que se estaba operando (18 g L^{-1}), dado que se recomienda operar a concentraciones de SST entre $8 \text{ y } 12 \text{ g L}^{-1}$ (Sánchez et al., 2013) y a la pérdida de nitrificación, dado que se conoce como un factor que influye negativamente al rendimiento de una membrana (Sepehri and Sarrafzadeh, 2018). Las siguientes limpiezas de mantenimiento se realizaron los días 353, 405, 426 y 501. El ensuciamiento causante de la limpieza del día 405 fue debido a problemas operacionales; la bomba de permeado y la aireación de la membrana se pararon debido a un corte de electricidad, arrancándose al mismo tiempo tras restablecerse la tensión. Esta limpieza no fue efectiva, por lo que se necesitó realizar otra en el día 426. Para todas las primeras limpiezas, se recuperó la permeabilidad de la membrana casi por completo (Figura 5.20).

EVALUACIÓN DE LA TECNOLOGÍA SIAM PARA EL TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES DE LA INDUSTRIA LÁCTEA

Realizando una corrección del flujo de la membrana con la temperatura (Ecuación 5.1), se puede calcular el impacto de la temperatura en la permeabilidad. Con los resultados obtenidos, a temperatura no fue la responsable del ensuciamiento de la membrana. La tasa de ensuciamiento calculada fue de unos 0,5 mbar d⁻¹ durante los primeros 200 días, empezando en 1000 L m⁻² h⁻¹ bar⁻¹ hasta los 200 L m⁻² h⁻¹ bar⁻¹, cuando se alcanzó el estado estacionario (Figura 5.19).

$$J_{T_0} = J \left[\frac{42,5 + T_0}{42,5 + T} \right]^{1,5} \quad \text{Ecuación 5.1}$$

Donde J es el flujo observado (LMH), J_{T0} es el flujo a una temperatura de referencia (LMH), T es la temperatura del agua (°C) y T₀ es la temperatura de referencia (°C).

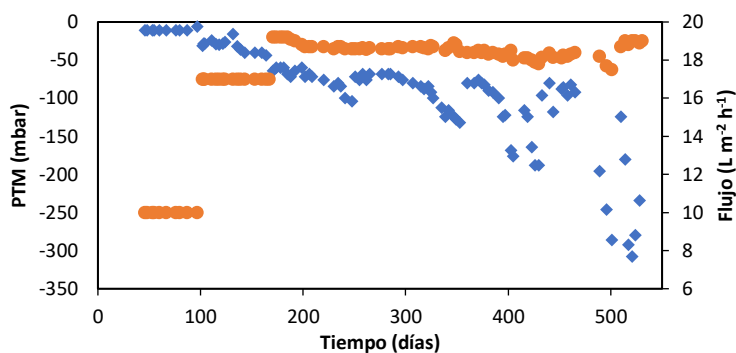


Figura 5.19. Comportamiento de la membrana de ultrafiltración: Presión Transmembrana (azul) y Flujo de la membrana (naranja).

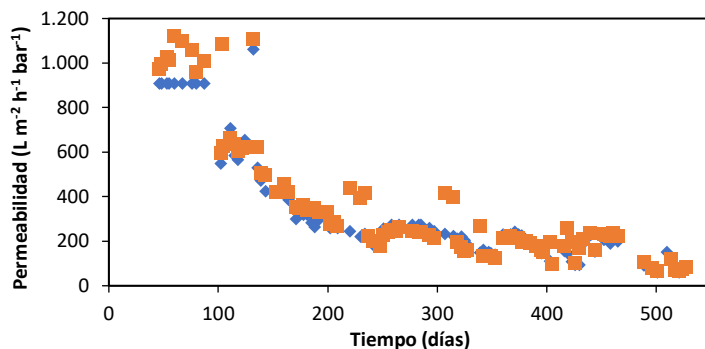


Figura 5.19. Permeabilidad de la membrana observada (azul) y corregida a 20 °C (naranja).

La membrana de OI se operó con un caudal de alimentación de permeado del sistema SIAM de 90 L h⁻¹, siendo el caudal de rechazo de 30 L h⁻¹ y por tanto la conversión de agua alimentada en agua osmotizada del 77%. Para prevenir el ensuciamiento de la membrana de OI, se siguieron los protocolos de limpieza del fabricante. La temperatura de operación del módulo de OI osciló entre 12 y 20 °C.

La concentración de cationes, principalmente Na⁺, en el permeado del postratamiento con membrana, en torno a 850 mg L⁻¹, seguido de Ca²⁺ (30-50 mg L⁻¹) y K⁺ (18-24 mg L⁻¹), se reducen notablemente en el agua osmotizada, disminuyendo la concentración de Na⁺ a unos 14 mg L⁻¹ y la de Ca²⁺ y K⁺ a menos de 2 mg L⁻¹ confirmando la reducción observada de conductividad, de 2,9-3,7 mS cm⁻¹ en alimentación a menos de 0,1 mS cm⁻¹ en el permeado de OI obtenido.

Una de las ventajas que presenta la tecnología SIAM, es la de integrar una unidad MBR con membrana de ultrafiltración, siendo la tecnología MBR una de las mejores tecnologías disponibles (MTD) a la hora de reutilizar las aguas saneadas en la industria, tal como señalara el estudio de MTD del “IPPC Bureau de la UE” para el sector (Giner-Santonja et al., 2019).

5.4 CONCLUSIONES

En este estudio se ha testado la tecnología SIAM con agua residual real de una industria láctea. El proceso SIAM mostró ser robusto para esta agua residual industrial con una alta variabilidad en la composición de contaminantes. A pesar de las variaciones observadas de temperatura, pH y carga contaminante, en el permeado del

sistema se observaron valores de DQO, NT y SS por debajo del límite de descarga que tiene la depuradora de la factoría.

La etapa anaerobia UASB trabajó con un TRH de 11h, eliminando el 45-70% de la DQO_T de entrada, con una producción de metano limitada por debajo de 25 °C. La conversión global de DQO en metano fue del 40%, considerando el metano presente en el biogás y el metano disuelto en el efluente. La composición de metano en el biogás fue del 60-75%. El biogás generado a escala industrial podría emplearse en calderas de vapor para el proceso como combustible renovable, sustituyendo una fracción del gas natural consumido por la factoría.

El postratamiento MBR del sistema SIAM eliminó la fracción restante de DQO, al menos un 25% del metano disuelto en la cámara anóxica y un 70-85% del NT presentes en el efluente del UASB. El TRH se mantuvo en 15h en esta etapa. El NT presente en el permeado fue menor a 13 mg L⁻¹ durante un largo período, que podría ser variado manipulando la relación de recirculación externa en el MBR. La tasa global de crecimiento de la biomasa se situó en torno a 0,11 g SST g⁻¹ DQO tratada. Este valor es mucho menor a los observados en plantas de tratamiento de aguas residuales basadas en sistemas de lodos activos convencionales tratando efluentes similares.

5.5 BIBLIOGRAFÍA

- A.C. van Haandel, G. Lettinga, 1994. *Anaerobic Sewage Treatment – A Practical Guide for Regions with a Hot Climate*. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, UK.
- Ahn, J.H., Forster, C.F., 2002. The effect of temperature variations on the performance of mesophilic and thermophilic anaerobic filters treating a simulated papermill wastewater. *Process Biochem.* 37, 589–594. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(01\)00245-X](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(01)00245-X)
- Akansha, J., Nidheesh, P. V., Gopinath, A., Anupama, K. V., Suresh Kumar, M., 2020. Treatment of dairy industry wastewater by combined aerated electrocoagulation and phytoremediation process. *Chemosphere* 253, 126652. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126652>
- Arias, A., Alvarino, T., Allegue, T., Suárez, S., Garrido, J.M., Omil, F., 2018. An innovative wastewater treatment technology based on UASB and IFAS for cost-efficient macro and micropollutant removal. *J. Hazard. Mater.* 359, 113–

120. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.07.042>
- Buntner, D., Sánchez, A., Garrido, J.M., 2013. Feasibility of combined UASB and MBR system in dairy wastewater treatment at ambient temperatures. *Chem. Eng. J.* 230, 475–481. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2013.06.043>
- Capodici, M., Corsino, S.F., Di Trapani, D., Torregrossa, M., Viviani, G., 2019. Effect of biomass features on oxygen transfer in conventional activated sludge and membrane bioreactor systems. *J. Clean. Prod.* 240, 118071. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.118071>
- Carvalho, F., Prazeres, A.R., Rivas, J., 2013. Cheese whey wastewater: Characterization and treatment. *Sci. Total Environ.* <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.12.038>
- De Jager, D., Sheldon, M.S., Edwards, W., 2014. Colour removal from textile wastewater using a pilot-scale dual-stage MBR and subsequent RO system. *Sep. Purif. Technol.* 135, 135–144. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2014.08.008>
- Elmitwalli, T.A., Otterpohl, R., 2007. Anaerobic biodegradability and treatment of grey water in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.12.016>
- Giner-Santonja, G., Karlis, P., Stubdrup, K., Brinkmann, T., Roudier, S., 2019. Best Available Techniques (BAT) Reference Document for the Food, Drink and Milk Industries. <https://doi.org/10.2760/243911>
- Gomes, D.R.S., Papa, L.G., Cichello, G.C.V., Belançon, D., Pozzi, E.G., Balieiro, J.C.C., Monterrey-Quintero, E.S., Tommaso, G., 2011. Effect of enzymatic pretreatment and increasing the organic loading rate of lipid-rich wastewater treated in a hybrid UASB reactor. *Desalination* 279, 96–103. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2011.05.067>
- Habermacher, J., Benetti, A.D., Derlon, N., Morgenroth, E., 2015. The effect of different aeration conditions in activated sludge - Side-stream system on sludge production, sludge degradation rates, active biomass and extracellular polymeric substances. *Water Res.* 85, 46–56. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.08.002>
- Haugen, F., Bakke, R., Lie, B., Hovland, J., Vasdal, K., 2015. Optimal design and operation of a UASB reactor for dairy cattle manure. *Comput. Electron. Agric.* 111, 203–213. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2015.01.001>

- Hwu, C.S., Tseng, S.K., Yuan, C.Y., Kulik, Z., Lettinga, G., 1998. Biosorption of long-chain fatty acids in UASB treatment process. *Water Res.* 32, 1571–1579. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(97\)00352-7](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(97)00352-7)
- Judd, S., 2002. Submerged membrane bioreactors: Flat plate or hollow fibre? *Filtr. Sep.* 39, 30–31. [https://doi.org/10.1016/S0015-1882\(02\)80169-0](https://doi.org/10.1016/S0015-1882(02)80169-0)
- Liew, Y.X., Chan, Y.J., Manickam, S., Chong, M.F., Chong, S., Tiong, T.J., Lim, J.W., Pan, G.T., 2020. Enzymatic pretreatment to enhance anaerobic bioconversion of high strength wastewater to biogas: A review. *Sci. Total Environ.* <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.136373>
- Liñares, A., 2018. Modelado do ciclo de xofre en post-tratamentos de efluentes de reactores anaerobios. Universidade de Santiago de Compostela.
- Metcalf&Eddy, Tchobanoglous, G., Stensel, D., Tsuchihashi, R., Burton, F., 2014. *Wastewater Engineering, Fifth edit. ed.* McGraw Hill, New York.
- Miranda, L.A.S., Henriques, J.A.P., Monteggia, L.O., 2006. Performance of UASB and DAEB reactors in the anaerobic digestion of synthetic wastewater containing sodium oleate and sodium stearate. *Water Sci. Technol.* 54, 127–133. <https://doi.org/10.2166/wst.2006.495>
- Passeggi, M., López, I., Borzacconi, L., 2012. Modified UASB reactor for dairy industry wastewater: Performance indicators and comparison with the traditional approach. *J. Clean. Prod.* 26, 90–94. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2011.12.022>
- Rivas, J., Prazeres, A.R., Carvalho, F., Beltrán, F., 2010. Treatment of cheese whey wastewater: Combined Coagulation - Flocculation and aerobic biodegradation. *J. Agric. Food Chem.* 58, 7871–7877. <https://doi.org/10.1021/jf100602j>
- Sahinkaya, E., Tuncman, S., Koc, I., Guner, A.R., Ciftci, S., Aygun, A., Sengul, S., 2019. Performance of a pilot-scale reverse osmosis process for water recovery from biologically-treated textile wastewater. *J. Environ. Manage.* 249, 109382. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.109382>
- Sánchez, A., Buntner, D., Garrido, J.M., 2013. Impact of methanogenic pre-treatment on the performance of an aerobic MBR system. *Water Res.* 47, 1229–1236. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.11.042>
- Sánchez, A., Rodríguez-Hernández, L., Buntner, D., Esteban-García, A.L., Tejero, I., Garrido, J.M., 2016. Denitrification coupled with methane oxidation in a

- membrane bioreactor after methanogenic pre-treatment of wastewater. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 91, 2950–2958. <https://doi.org/10.1002/jctb.4913>
- Seghezzo, L., Guerra, R.G., González, S.M., Trupiano, A.P., Figueroa, M.E., Cuevas, C.M., Zeeman, G., Lettinga, G., 2002. Removal efficiency and methanogenic activity profiles in a pilot-scale UASB reactor treating settled sewage at moderate temperatures. *Water Sci. Technol. a J. Int. Assoc. Water Pollut. Res.* 45, 243–248.
- Sepehri, A., Sarrafzadeh, M.H., 2018. Effect of nitrifiers community on fouling mitigation and nitrification efficiency in a membrane bioreactor. *Chem. Eng. Process. - Process Intensif.* 128, 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2018.04.006>
- Silva-Teira, A., Sánchez, A., Buntner, D., Rodríguez-Hernández, L., Garrido, J.M., 2017. Removal of dissolved methane and nitrogen from anaerobically treated effluents at low temperature by MBR post-treatment. *Chem. Eng. J.* <https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.06.047>
- Singh, S., Rinta-Kanto, J.M., Kettunen, R., Tolvanen, H., Lens, P., Collins, G., Kokko, M., Rintala, J., 2019. Anaerobic treatment of LCFA-containing synthetic dairy wastewater at 20 °C: Process performance and microbial community dynamics. *Sci. Total Environ.* 691, 960–968. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.07.136>
- Souza, C.L., Chernicharo, C.A.L., Aquino, S.F., 2011. Quantification of dissolved methane in UASB reactors treating domestic wastewater under different operating conditions. *Water Sci. Technol.* 64, 2259–2264. <https://doi.org/10.2166/wst.2011.695>
- Van Lier, J.B., Vashi, A., Van Der Lubbe, J., Heffernan, B., 2010. Anaerobic sewage treatment using UASB reactors: Engineering and operational aspects, in: *Environmental Anaerobic Technology: Applications and New Developments*. Imperial College Press, pp. 59–89. https://doi.org/10.1142/9781848165434_0004
- Wang, Y., Serventi, L., 2019. Sustainability of dairy and soy processing: A review on wastewater recycling. *J. Clean. Prod.* <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.117821>

CAPÍTULO 6

EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE ELIMINACIÓN DE METANO DISUELTO, NITRÓGENO Y MICROCONTAMINANTES ORGÁNICOS EN CULTIVOS N-DAMO MEDIANTE BIORREACTORES DE MEMBRANAS

Resumen

Se operaron dos reactores MBR (R1 y R2) con cultivo de bacterias n-damo, con objeto de aumentar el conocimiento de los factores que pueden afectar al crecimiento o mejora de la actividad de dichos microorganismos. El sistema R1 se utilizó para el estudio de la eliminación de microcontaminantes orgánicos (OMPs) por cultivos n-damo. Transcurridos tan solo 30 días de operación se obtuvieron velocidades de eliminación de nitrito de $24 \text{ mg N L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, alcanzando su capacidad máxima de $55 \text{ mg N L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, obteniendo un 40% de abundancia relativa para la bacteria *C. Methyloirabilis*. Se observó en R1 una eliminación casi completa de las hormonas naturales E1 y E2 y una eliminación parcial para los compuestos ERY, FLX, ROX y SMX.

Para el segundo biorreactor de membrana R2 se siguieron diferentes estrategias de cara a potenciar la estabilidad y capacidad desnitrificante de los cultivos n-damo. La entrada de pequeñas cantidades de oxígeno con el medio de alimentación pareció fomentar ligeramente la actividad desnitrificante ($88 \text{ mg N L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) pero no resuelve los problemas de estabilidad observados, por lo que se procedió a desoxigenar las bolsas de alimentación. El aumento ligero en la salinidad del alimento utilizado, usando hasta un 5% de agua de mar, no causó tampoco ningún efecto positivo o negativo aparente. A partir del día de operación 717 se modificó la concentración de los macronutrientes fósforo y calcio en el medio de alimentación, logrando con esa acción reducir la aparición de precipitados de fosfato de calcio que se observaran en el cultivo microbiano. Esta acción causó una mejora tanto en la estabilidad del sistema, no observando caídas de capacidad sin causa aparente, y alcanzando una capacidad desnitrificante de $118 \text{ mg NO}_2\text{-N L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Se detectó la baja

biodisponibilidad de metales traza como hierro y cobre en el permeado de R2 por lo que en el día de operación 787 se añadió un agente quelante de metales, Na₂EDTA, al medio de alimentación. El resultado ha sido una subida inmediata en la actividad del reactor hasta alcanzar la velocidad máxima de eliminación de nitrito de 282,7 mg NO₂⁻-N L⁻¹ d⁻¹ y manteniendo durante los últimos 35 días de operación una capacidad desnitrificante de 262,2 ± 9,2 mg NO₂⁻-N L⁻¹ d⁻¹.

Parte de este artículo ha sido publicado en: M. Martínez-Quintela¹, **A. Arias**¹, T. Alvarino², S. Suárez¹, J.M. Garrido¹, F. Omil¹, 2021. Cometary removal of organic micropollutants by enriched nitrite-dependent anaerobic methane oxidizing cultures. J. Hazard. Mater. 402, 123450. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123450>. ¹Department of Chemical Engineering, School of Engineering, University of Santiago de Compostela, Campus Vida, Santiago de Compostela, E-15782, Spain. ²Galician Water Research Center Foundation (Cetaqua Galicia), Emprendia Building, University of Santiago de Compostela, Campus Vida, Santiago de Compostela, E-15782, Spain. Factor de Impacto: 6.4. Categoría revista: Q1. Editorial Elsevier. Una parte del **Capítulo 6** ha sido publicado en este artículo. Contribución a la publicación: Conceptualización, Investigación y operación, Escritura borrador original; todo ello única y exclusivamente de la parte que corresponde a la contribución de la autoría de esta tesis doctoral, que es la parte de contaminantes convencionales en los días de operación reflejados en este capítulo, que se corresponden solamente con una fracción de la totalidad de la publicación. Los resultados relativos a OMPs mostrados en este capítulo no han sido publicados.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

6.1 INTRODUCCIÓN	153
6.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	156
6.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	159
6.3.1 Rendimiento del biorreactor de membrana R1	159
6.3.2 Composición de la comunidad microbiana en el biorreactor de membrana R1	162
6.3.3 El papel de bacterias n-damo en la eliminación de OMPs	166
6.3.4 Biorreactor de membrana R2.....	168
6.3.5 Evolución de la diversidad microbiana en R2	177
6.4 CONCLUSIONES	179
6.5 BIBLIOGRAFÍA	180



6.1 INTRODUCCIÓN

En la actualidad es necesario desarrollar tecnologías de tratamiento de aguas residuales más eficientes en términos de su huella ambiental. Además, el desafío de los microcontaminantes orgánicos en las aguas residuales es un tema de creciente preocupación que debe ser considerado en el diseño y operación de estas nuevas tecnologías. Los tratamientos anaerobios metanogénicos, usando normalmente reactores UASB, se han implantado en EDAR ubicadas en regiones cálidas y templadas del planeta. Este proceso tiene unos menores requerimientos energéticos en comparación con los sistemas aerobios de lodos activos, sin embargo, mediante el uso de sistemas anaerobios incrementa las emisiones de GEI asociadas al tratamiento de las aguas residuales. Una de las principales causas es la presencia de metano disuelto en los efluentes anaerobios, con un potencial de calentamiento global 28 veces superior al CO₂ en un horizonte de 100 años según el quinto informe del Panel Intergubernamental del Cambio Climático (IPCC Intergovernmental Panel on Climate Change, 2013).

La potencial limitación de materia orgánica para un posterior postratamiento de eliminación de nitrógeno, así como la emisión de gases de efecto invernadero derivados del metano disuelto contenido en los efluentes anaeróbicos, parecen cuestionar el uso de tecnologías de tratamiento anaerobio de aguas residuales urbanas (Noyola et al., 2006). Como respuesta a esta problemática, el uso de microorganismos desnitrificantes de oxidación anaeróbica de metano (n-damo), descubiertos hace menos de tres lustros, podría ser una alternativa muy interesante, ya que las bacterias n-damo son capaces de reducir el nitrato a nitrógeno utilizando como fuente de electrones de bajo coste el metano disuelto, contrarrestando con los mismos dos de los principales problemas de las tecnologías anaerobias; por tanto, no sería necesaria o se disminuiría la adición de fuentes de carbono externas costosas, como metanol o etanol, para la desnitrificación de nitrato y se reduciría la generación de lodo. Estas bacterias descubiertas en los últimos años (*Candidatus Methylophilum*: *M. oxyfera*, *M. sinica* y *M. lanthanidiphila*), pertenecientes al filo NC10, son capaces de oxidar el metano, en condiciones anaerobias, mediante el uso de nitrato como aceptor de electrones por medio de una ruta de desnitrificación intra-aerobia (Ettwig et al., 2010; He et al., 2016a; Versantvoort et al., 2018). Entre ellos, “*Candidatus Methylophilum oxyfera*” sería el organismo dominante involucrado en el proceso n-damo (Ettwig et al., 2010) y también el más estudiado. Este microorganismo utiliza una ruta metabólica no descrita previamente en otros organismos, que produce una molécula

de oxígeno a partir de la dismutación de dos moléculas de monóxido de nitrógeno. El oxígeno que se formaría se usaría, posteriormente, para oxidar metano de una forma muy parecida a la que emplean los metanótrofos aerobios (van Kessel et al., 2018).

Con objeto de aumentar el conocimiento de los microorganismos y de cara al posterior desarrollo de procesos n-damo aplicados al tratamiento de aguas residuales, se debe profundizar en el conocimiento de las características fundamentales de los microorganismos n-damo, por ello, se han utilizado diferentes tipos de reactores para el cultivo de microorganismos n-damo: reactor continuo de tanque agitado (RCTA), reactor discontinuo secuencial (SBR) y reactor air-lift con agitación magnética (MSGLR) (Hu et al., 2014); los resultados mostraron que el MSGLR obtuvo mejores velocidades de eliminación de nitrito, $77 \text{ mg NO}_2^- \text{-N L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, que los observados para el RCTA, $25 \text{ mg NO}_2^- \text{-N L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, o en el SBR, $10 \text{ mg NO}_2^- \text{-N L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, como resultado, presumiblemente, de la mejor transferencia gas-líquido de metano en el sistema MSGLR, aunque se observó el lavado de la biomasa. Una de las estrategias que se pueden utilizar para reducir el lavado de biomasa, observado en los sistemas descritos anteriormente, sería la de utilizar tecnología de biorreactores de membranas (MBR) con recirculación interna de gas, obteniendo valores de eliminación de nitrito que van desde $37 \text{ mg NO}_2^- \text{-N L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ (Kampman et al., 2014) hasta los $106 \text{ mg NO}_2^- \text{-N L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ obtenidos en nuestros laboratorios por Allegue et al. (2018).

Otra estrategia que permite en la actualidad alcanzar mayores velocidades de desnitrificación, es aquella en la que se combinan en sistemas de membranas el cultivo de n-damo bacteria y arquea así como microorganismos anammox, ya sea en un reactor de biopelícula de membrana (MBfR) alcanzando velocidades de $882 \text{ mg NT L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ (Cai et al., 2015) o $2497 \text{ mg NT L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ que se han logrado empleando un MBR en el que se usa, adicionalmente, un segundo módulo de membrana para fomentar la transferencia gas-líquido de una mezcla de 95% de metano y 5% de dióxido de carbono (MAMBR), en la que la presencia de n-damo bacteria ha sido baja (Nie et al., 2019).

Uno de los problemas que se ha referido en la operación de sistemas n-damo ha sido la inestabilidad a largo plazo, encontrándose caídas de la actividad sin causa justificada (Kampman et al., 2014). En este sentido se debe señalar que el medio de cultivo propuesto por Ettwig et al. (2009) es el más empleado en estudios con microorganismos n-damo. De cara a estimular la actividad de los microorganismos n-damo se han llevado a cabo estudios enfocados en la composición de metales traza

EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE ELIMINACIÓN DE METANO DISUELTO, NITRÓGENO Y MICROCONTAMINANTES ORGÁNICOS EN CULTIVOS N-DAMO MEDIANTE BIORREACTORES DE MEMBRANAS

que han determinado que la adición de hierro y cobre en cantidades traza, mejoran aparentemente la actividad n-damo (He et al., 2015a; Lu et al., 2018), mientras que hierro, cobre y molibdeno estimulan, además, el crecimiento bacteriano en co-cultivos n-damo y bacterias metanogénicas (Jiang et al., 2018).

Exceptuando una primera tentativa reciente de Lim et al. (2021) que ha tenido cierto éxito, los estudios realizados hasta el momento, aunque han aportado mucha información, no han permitido como resultado dar el salto a escala industrial de procesos n-damo robustos y fiables, para el tratamiento de efluentes de biorreactores anaerobios metanogénicos. Las investigaciones previas desarrolladas en nuestros laboratorios con la tecnología SIAM (Alvarino et al., 2019; Sánchez et al., 2016; Silva-Teira et al., 2017a) que combina una primera etapa UASB para el tratamiento de aguas residuales con un postratamiento en MBR híbrido, han permitido detectar que una parte de la eliminación de nitrógeno observada, se debía a procesos de oxidación anaerobia de metano, siendo la contribución de microorganismos aerobios metanogénicos muy elevada y la presencia de microorganismos n-damo, a pesar de la eliminación anaerobia observada, más bien escasa. Sigue, por tanto, pendiente el desarrollo de sistema procesos innovadores de postratamiento de efluentes de biorreactores anaerobios metanogénicos, que permitan aprovechar toda la potencialidad que podrían ofrecer los procesos n-damo por sí solos o combinados, por ejemplo, con microorganismos anammox. Para ello es fundamental el comprender que factores promueven el crecimiento y la estabilidad de cultivos de microorganismos n-damo y determinar con cierta precisión, posibles sinergias y antagonismos con otros procesos, así como determinar aspectos más básicos como la posible actividad específica y capacidad volumétrica máxima de los cultivos.

Al mismo tiempo, se debe abordar el desafío actual de la presencia de contaminantes emergentes en las aguas en general y en particular la presencia de microcontaminantes orgánicos en las aguas residuales y su potencial eliminación por vía biológica. Las características peculiares de los cultivos n-damo, con generación interna de oxígeno por dismutación de monóxido de nitrógeno, hace que sea muy interesante el investigar la eliminación de microcontaminantes orgánicos mediante microorganismos n-damo, pues estos microorganismos son capaces de eliminar metano y nitrógeno de forma simultánea en ambientes anóxicos/anaerobios, proclamándose como candidatos para desarrollar procesos innovadores con altas eficacias de eliminación de nitrógeno y baja huella ambiental (Liu et al., 2019). Sin embargo, los procesos n-damo no están implementados en las estaciones depuradoras

de aguas residuales por su bajo rendimiento de eliminación de nitrógeno (Wang et al., 2017). El conocimiento del comportamiento de estos microorganismos bajo la presencia de microcontaminantes es desconocido, por lo que se requiere más investigación.

El objetivo de este estudio fue evaluar específicamente el crecimiento de bacterias n-damo en un biorreactor de membrana, en el que se están desarrollando estos nuevos microorganismos, tratando un afluente sintético que estimule su crecimiento y ver potenciales factores que afectan positiva o negativamente al mismo. La eliminación de iones de nitrógeno y metano disuelto será objeto de seguimiento junto con las capacidades de este proceso para eliminar microcontaminantes orgánicos; De la misma manera, se estudiará por separado las causas de inestabilidad del sistema a largo plazo en un segundo reactor.

6.2 MATERIALES Y MÉTODOS

Se han operado dos biorreactores de membrana (MBR) de iguales características, de 10 L de capacidad y volumen de trabajo 6,65 L en los que se enriquecen cultivos de bacterias n-damo.

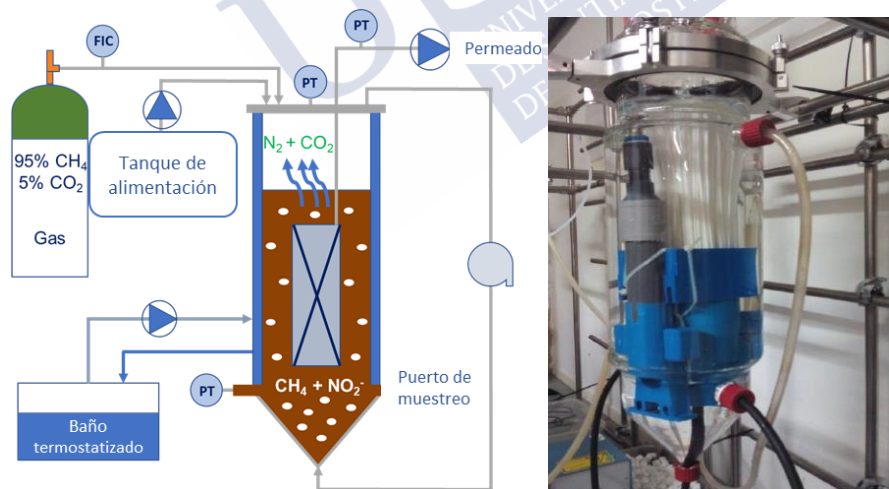


Figura 6.1. Diagrama de flujo empleado (a la izquierda) y fotografía de uno de los biorreactores (derecha) empleados en la experimentación en ambos sistemas.

EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE ELIMINACIÓN DE METANO DISUELTO, NITRÓGENO Y MICROCONTAMINANTES ORGÁNICOS EN CULTIVOS N-DAMO MEDIANTE BIORREACTORES DE MEMBRANAS

El primer MBR (R1) se operó para evaluar la capacidad de eliminación de microcontaminantes orgánicos durante 412 días experimentales, mientras que en un segundo sistema MBR (R2) se empleó durante 878 días para evaluar estrategias de operación que permitiesen obtener altas actividades de procesos n-damo estables a largo plazo; entre esas estrategias se evaluó el impacto de una concentración moderada de oxígeno en alimentación (días de operación 83-249), el efecto de la salinidad, usando agua de mar filtrada como fuente de iones (día de operación 397-716) para estudiar su impacto en la estabilidad del proceso n-damo y el impacto de la biodisponibilidad de compuestos como calcio, fósforo, hierro y cobre en la alimentación (días de operación 717-878) buscando óptimos de operación que permitiesen alcanzar actividades más altas de forma estable.

Se han empleado en ambos reactores sendos módulos sumergidos de membrana de ultrafiltración de fibra hueca (Puron), con el que lograr la completa retención de los microorganismos n-damo, con un área y un tamaño de poro respectivamente de 0,5 m² y 0,03 µm. Las membranas se operaron con ciclos de 7 minutos de permeación y 0,5 minutos de relajación. Para medir las presiones transmembrana de permeación y relajación se emplearon sensores PN2069 (IFM). Dentro de R1 se instaló una sonda de pH Atlas Scientific, mientras que en R2 se instaló un sensor de potencial oxidación-reducción Hamilton Polyplast ORP BCN a partir del día de operación 571. Ambos reactores se mantuvieron a 28 °C mediante baños termostatzados, y se monitorizó la temperatura por medio de un sensor DS18B20.

El medio de alimentación contuvo 9 mg L⁻¹ de NH₄Cl, 100 mg L⁻¹ de NaHCO₃, y una concentración variable de NaNO₂ en función de la actividad del reactor como fuente de nitrito. Los macronutrientes y los compuestos traza son los propuestos por Allegue et al (Allegue et al., 2018), empleando la misma estrategia de operación, con modificaciones en R2 que se detallan en el apartado de resultados (Tabla 6.1). Se suministró una mezcla de gas 95% CH₄ y 5% CO₂ usando un controlador de flujo de masa 4800 Series (Brooks).

Para el estudio de eliminación de microcontaminantes en R1 se seleccionaron 12 compuestos presentes en las aguas residuales y se alimentaron en continuo: tres neurodrogas (FLX, CBZ, DZP), cuatro antibióticos (ERY, ROX, SMX, TMP), tres disruptores endocrinos (E1, E2, EE2) y dos antiinflamatorios (IBP, NPX). Se alimentaron a partir del día 35 de operación en una concentración de 1 ppb, simulando concentraciones ambientales. El muestreo se realizó en la alimentación y permeado,

excluyendo la fase sólida debido a la baja concentración de biomasa en el reactor y la limitada capacidad de sorción de los microcontaminantes seleccionados en el lodo.

Tabla 6.1. Concentración de nutrientes y micronutrientes empleada al inicio de la experimentación, y la propuesta realizada durante la experimentación de R2.

Compuesto	Medio propuesto por Ettwig et al. (2009)	Medio propuesto en este estudio	Unidades
KH ₂ PO ₄	50	5	mg L ⁻¹
CaCl ₂	200	20	mg L ⁻¹
MgCl ₂ ·6H ₂ O	33	33	mg L ⁻¹
MgSO ₄	10	10	mg L ⁻¹
Na ₂ AEDT	-	1,4	mg L ⁻¹
Se	9,5	9,5	µg Se L ⁻¹
W	5,6	5,6	µg W L ⁻¹
Mo	22,6	22,6	µg Mo L ⁻¹
Fe	209,5	209,5	µg Fe L ⁻¹
Zn	7,7	7,7	µg Zn L ⁻¹
Co	14,9	14,9	µg Co L ⁻¹
Mn	110	110	µg Mn L ⁻¹
Cu	63,8	63,8	µg Cu L ⁻¹
Ni	11,8	11,8	µg Ni L ⁻¹
B	1,2	1,2	µg B L ⁻¹

El inóculo de R1 se tomó de un MBR pre-anóxico desnitrificante del sistema SIAM donde metano disuelto era usado como fuente de carbono (Silva-Teira et al., 2017b). La biomasa inoculada se gaseó se con metano, añadiendo nitrato en concentraciones menores a 5 mg L⁻¹ previo al arranque del enriquecimiento n-damo llevado a cabo en este capítulo, con el fin de prevenir o reducir la eliminación de nitrógeno por decaimiento celular. La concentración inicial de sólidos fue 0,5 g L⁻¹. Esta biomasa estaba compuesta por una elevada variedad microbiana, con una baja presencia de n-damo bacteria.

El reactor R2 se arrancó previamente por Allegue et al. (2018) para desarrollar un cultivo enriquecido en n-damo bacteria, que se operó durante 388 días. Este día es, a todos los efectos, el día 0 de operación del presente capítulo, momento en el que la concentración de sólidos suspendidos volátiles del licor de mezcla (SSVLM) era de 1,08 g L⁻¹.

EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE ELIMINACIÓN DE METANO DISUELTO, NITRÓGENO Y MICROCONTAMINANTES ORGÁNICOS EN CULTIVOS N-DAMO MEDIANTE BIORREACTORES DE MEMBRANAS

El medio sintético de alimentación contuvo 27 mg L⁻¹ de NH₄Cl, 100 mg L⁻¹ de NaHCO₃, y una concentración variable comprendida entre 100 y 1.232 mg L⁻¹ NaNO₂ en función de la actividad del reactor como fuente de nitrito. Se emplearon los mismos macronutrientes y compuestos traza que en R1 al inicio de la experimentación, variándolos a lo largo de la experimentación.

Se emplearon bolsas de alimentación recubiertas con hojas de aluminio, totalmente impermeables al oxígeno, para alimentar ambos sistemas. Las bolsas de aluminio se desoxigenaron para evitar la presencia de oxígeno burbujeando el medio preparado con gas nitrógeno durante 10 minutos.

En ambos reactores R1 y R2 se estableció una recirculación de gas, enriquecido en metano, de 5,5 L min⁻¹ procedente de la parte alta del reactor hacia la parte baja por medio de dos soplantes N 86 KT.18 (Laboport) con objeto de mantener la agitación de la biomasa en suspensión y de evitar limitaciones de metano y CO₂, previniendo el ensuciamiento de las membranas.

6.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.3.1 Rendimiento del biorreactor de membrana R1

El reactor R1 se operó durante 281 días a 28,3 ± 0,3 °C, con un caudal de 6,7 ± 0,3 L d⁻¹, que se corresponde con un TRH de 0,99 ± 0,04 d⁻¹. El pH varió entre 6,7 y 7,9 con una media y desviación estándar de 7,2 ± 0,3. La velocidad de carga de nitrito se incrementó de acuerdo con la actividad del reactor, procurando que el nitrito residual presente en el sistema fuese lo más bajo posible, para evitar una potencial inhibición del proceso n-damo por nitrito.

Durante la operación de R1 se pueden distinguir 3 períodos en la operación: Periodo 1 (días 0-29), que se corresponde con la puesta en marcha del biorreactor; Periodo 2 (días 30-184), que se corresponde con el enriquecimiento en n-damo bacteria y alcance de la capacidad máxima de eliminación de nitrito; y Periodo 3 (días 185-281), que se inicia tras un fallo operacional que causa una bajada temporal de la capacidad de eliminación de nitrito del sistema, donde se observa que el sistema ha alcanzado su capacidad máxima.

El empleo de bolsas de alimentación impermeables al oxígeno y la desoxigenación del alimento, procedimiento sugerido por Allegue et al. (2018),

permitió acelerar el arranque del sistema en el Periodo 1, con respecto estudios de otros autores (Bhattacharjee et al., 2016; Li et al., 2020; Ma et al., 2017) y los obtenidos previamente en nuestros laboratorios (Allegue et al., 2018). La concentración de nitrito, y con ello la velocidad de carga de nitrito, se ajustó para que el nitrito residual fuese bajo o nulo durante toda la operación (Figura 6.2) y el caudal alimentado, junto a la medida de las concentraciones de iones de nitrógeno en alimentación y efluente se emplearon para calcular las velocidades de eliminación de nitrógeno. Se obtuvieron velocidades de eliminación de nitrito de $13,4 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ tras 8 días de operación, alcanzando rápidamente los $24,0 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ el día de operación 29, con condiciones de limitación de nitrito residual en el medio, cuya concentración en el efluente durante el arranque se mantuvo entre 0 y $0,6 \text{ mg NO}_2\text{-N L}^{-1}$.

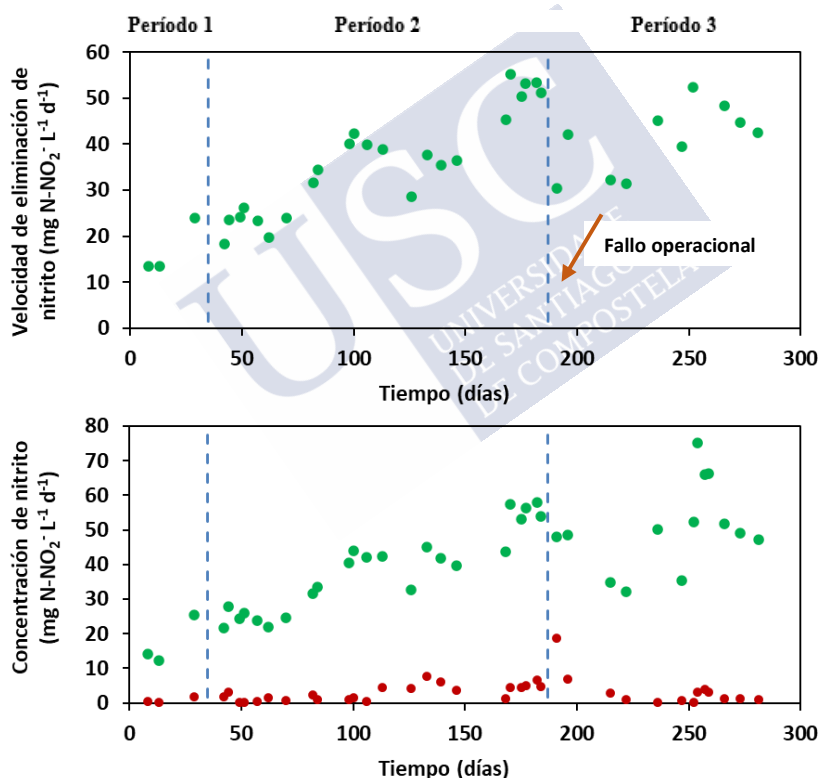


Figura 6.2. Evolución de la velocidad de consumo de nitrito en el biorreactor de membrana R1 en los tres periodos de operación (arriba), y concentraciones de nitrógeno como nitrito en alimentación (verde) y permeado (rojo) observadas en R1 (abajo). La flecha indica el fallo operacional sufrido en el día de operación 190.

EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE ELIMINACIÓN DE METANO DISUELTO, NITRÓGENO Y MICROCONTAMINANTES ORGÁNICOS EN CULTIVOS N-DAMO MEDIANTE BIORREACTORES DE MEMBRANAS

En el Periodo 2 se alimentaron de forma constante los OMPs seleccionados y se aumentó la carga de nitrato al sistema, manteniendo un nitrato residual entre 0 y 6 mg $\text{NO}_2^- \text{-N L}^{-1}$. El pH fue subiendo gradualmente desde 6,9 hasta un máximo de 7,9, ello se debe a que la desnitrificación llevada a cabo por n-damo bacteria genera iones hidroxilo, aumentando con ello la alcalinidad del medio (Ecuación 1.9). El 5% de CO_2 presente en la mezcla de gas fue suficiente para, con un caudal de gas de 10 L d^{-1} , contrarrestar los iones hidroxilo generados y mantener el pH por debajo de 8, manteniendo durante toda la operación una composición de CO_2 en el gas de salida mayor al 1,5%. El objetivo fue evitar la inhibición del proceso n-damo por subidas de pH (Allegue et al., 2018), ya que el proceso n-damo se inhibe considerablemente a valores de pH superiores a 9 (He et al., 2015b).

La actividad máxima del reactor se alcanzó entre el día de operación 170 y 184, tras pequeños incrementos de la velocidad de carga de nitrato, siendo la concentración de nitrato de 55,3 mg $\text{NO}_2^- \text{-N L}^{-1}$ y la velocidad de eliminación de nitrato de $52,7 \pm 2,0$ $\text{NO}_2^- \text{-N L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. La presencia de nitrato en el efluente en ese espacio de tiempo, de $5,1 \pm 0,9$ $\text{NO}_2^- \text{-N L}^{-1}$, indicó que el sistema había alcanzado su capacidad máxima para las condiciones del estudio. Esas actividades están en concordancia con otros enriquecimientos n-damo empleando biorreactores de membrana, como es el caso de Kampman et al. (2014), quien obtuvo valores máximos de 40 mg $\text{NO}_2^- \text{-N L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, o reactores discontinuos secuenciales (SBR), obteniendo 58,6 mg $\text{NO}_2^- \text{-N L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ (Hu et al., 2019).

El día de operación 200 se produjo una entrada accidental de aire al reactor por un fallo mecánico en la soplante de recirculación de gas, inhibiéndose parcialmente el sistema, con una caída de la actividad hasta 30,4 mg $\text{NO}_2^- \text{-N L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, evidenciando la extrema sensibilidad de estos microorganismos a la presencia de concentraciones elevadas de oxígeno (Luesken et al., 2012). Tras alcanzar las actividades máximas en el Periodo 2 y recuperarse el sistema de la entrada de oxígeno, la velocidad de eliminación de nitrato se recupera dentro del rango de 40 a 52 mg $\text{NO}_2^- \text{-N L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, con valores de nitrato en el efluente, comprendidas entre 1 y 3 mg $\text{NO}_2^- \text{-N L}^{-1}$, indicando que la capacidad máxima de eliminación del sistema estaba limitada a estos valores, con las condiciones operacionales utilizadas.

El amonio alimentado al sistema se mantuvo bajo, con el fin de limitar el crecimiento de bacterias anammox. El consumo de amonio fue menor a 1 mg $\text{NH}_4^+ \text{-N L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ hasta el día de operación 146, situándose en 1,8-3,2 mg $\text{NH}_4^+ \text{-N L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ hasta

el final de la operación. Sin embargo, la adición de amonio no ha supuesto efecto aparente alguno en el desarrollo de cultivos n-damo. Tampoco se ha observado crecimiento neto de la biomasa durante toda la operación, que se mantuvo en valores de SST y SSV en torno a 0,53 y 0,41 g L⁻¹, respectivamente, no siendo posible cuantificar la fracción de biomasa adherida a las paredes del reactor. Este bajo crecimiento de la biomasa n-damo era esperado debido a la baja tasa de crecimiento de microorganismos, con un tiempo de duplicación estimado en 11,5 días (Allegue et al., 2018). Se considera que la contribución de la desnitrificación heterótrofa convencional ha sido muy baja. A medida que avanzó la operación del sistema, se pudo observar la formación de una pequeña biopelícula en las paredes del reactor, poniendo de manifiesto la dificultad de cuantificar la cantidad de sólidos presentes en el sistema observada previamente (Kampman et al., 2014).

6.3.2 Composición de la comunidad microbiana en el biorreactor de membrana R1

No se detectaron microorganismos n-damo en el lodo usado como inóculo en el reactor R1 empleando la técnica microbiológica FISH. Tras observarse la primera actividad significativa de eliminación de nitrito en el día 8 de operación, en el que se alcanza una velocidad de eliminación de nitrito de 13,4 mg NO₂-N L⁻¹ d⁻¹, se realizó el análisis de la comunidad microbiana del reactor mediante análisis FISH y técnicas metagenómicas de secuenciación de ampliaciones del gen 16 s ARN (Illumina) para comprobar si pudiese ser debida a microorganismos n-damo. Las sondas FISH se emplearon para determinar la presencia de n-damo bacteria, n-damo arquea y anammox los días de operación 29, 54, 106 y 196. Se detectaron en grandes cantidades microorganismos n-damo por FISH el día 29 de operación, e, confirmando la rápida puesta en marcha del biorreactor de membrana y la estrategia utilizada. El enriquecimiento fue corroborado por el aumento en las abundancias observadas en análisis FISH desde el día de operación 54 en adelante. Por otra parte, los ensayos FISH confirmaron la ausencia de microorganismos n-damo arquea y anammox, ausencia esperada de acuerdo con los balances de componente realizados con la concentración de nitrato y amonio, que descartaban consumos apreciables de estos dos iones en el sistema R1.

EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE ELIMINACIÓN DE METANO DISUELTO, NITRÓGENO Y MICROCONTAMINANTES ORGÁNICOS EN CULTIVOS N-DAMO MEDIANTE BIORREACTORES DE MEMBRANAS

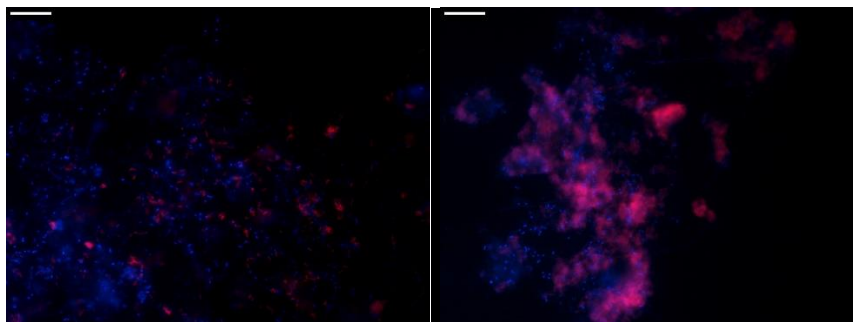


Figura 6.3. Presencia y enriquecimiento de *C. Methyloirabilis* detectados por FISH en los días de operación 29 (izquierda) y 196 (derecha) con sondas para n-damo bacteria (rosa). Se empleó DAPI para teñir todas las células. Las barras de escala indican 10 μm .

Como complemento a los ensayos FISH, se realizaron análisis metagenómicos del gen 16sARN mediante Illumina, de muestras de biomasa de los reactores para obtener información más precisa sobre la composición microbiana, en los días de operación 54 (Período 2), 196 y 257 (Periodo 3). Durante la experimentación no se detectó presencia de los microorganismos n-damo arquea mediante ensayos FISH, por lo que no se analizaron mediante la secuenciación de genes. La comunidad microbiana fue muy diversa taxonómicamente. Las unidades taxonómicas bacterianas (OTUs) se distribuyeron en 37 filos diferentes, de los cuales los más abundantes (tomando como referencia los mayores al 1%) representaron el $96,6\% \pm 0,7\%$ del total de OTUs pertenecientes a este nivel (Figura 6.4). El filo NC10 que está asociado a las bacterias n-damo (Ettwig et al., 2010) fue el de mayor abundancia en la muestra tomada en el Periodo 2, en torno a un 40%, seguido del filo *Proteobacteria*. En el Periodo 3 (muestra del día de operación 257), la abundancia relativa de bacterias n-damo sufrió una caída hasta un 20%, que puede estar asociada con la entrada de oxígeno en el reactor (Luesken et al., 2012), que pudo causar un impacto negativo en esta comunidad, y la consiguiente proliferación de otros microorganismos oportunistas favorecidos por la entrada puntual de oxígeno y posible decaimiento de parte de las comunidades microbianas existentes.

Las especies se distribuyeron en más de 100 familias. La familia *Methyloirabilaceae*, la familia asociada al filo NC10 a la que pertenece *Candidatus Methyloirabilis oxyfera*, fue la más abundante en todas las muestras analizadas. Se encontraron desnitrificantes convencionales heterótrofos como *Comamonaceae* o *Hyphomicrobiaceae*, también identificados por otros autores en cultivos de n-damo bacteria (Fu et al., 2017; Wang et al., 2019), siendo su abundancia relativa mayor en

el Periodo 3, 4,73% y 3,26%, respectivamente. Es probable que estos organismos empleen productos de decaimiento de la biomasa para llevar a cabo el proceso de desnitrificación convencional (Allegue et al., 2018). Los resultados de la última muestra ponen de manifiesto las consecuencias negativas que suponen la entrada de oxígeno en el sistema, que conllevó una reducción en la capacidad n-damo. Por tanto, resulta crucial mantener un ambiente completamente anóxico.

La desorción del oxígeno en las bolsas de alimentación posibilitó que la presencia de metanótrofos aerobios, como la familia *Methylococcaceae*, que representaban simplemente un 0,15% de la comunidad el día de operación 54 (Período 2) disminuyese al 0,02% durante el resto de la operación. Del mismo modo, la adición de amonio en una concentración limitada posibilitó alcanzar el objetivo de mantener controlado el crecimiento de bacterias anammox. La familia *Brocadiaceae* representó el 0,06% del total de la comunidad, sugiriendo que su presencia fue marginal. Así más, a pesar de la mayor afinidad de las bacterias anammox por nitrito con respecto a las bacterias n-damo, hace pensar que la contribución de las bacterias anammox a la desnitrificación llevada a cabo en este sistema ha sido residual.

Se observó un cambio acusado en la comunidad microbiana que se observó al final de la operación (día 257) cuando la biomasa estaba adaptada a la presencia de OMPs en la alimentación, aunque no existen motivos para creer que la presencia de estos compuestos haya afectado a la dinámica microbiana. Atendiendo a los resultados experimentales de eliminación de nitrógeno, los ensayos FISH y los análisis de secuenciación de genes 16 s ARN, se puede concluir que se desarrolló con éxito el enriquecimiento del cultivo de bacterias n-damo, con abundancias relativas similares a las alcanzadas por Allegue et al. (2018), siendo responsables de prácticamente la totalidad de la eliminación observada de nitrógeno.

EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE ELIMINACIÓN DE METANO DISUELTO, NITRÓGENO Y MICROCONTAMINANTES ORGÁNICOS EN CULTIVOS N-DAMO MEDIANTE BIORREACTORES DE MEMBRANAS

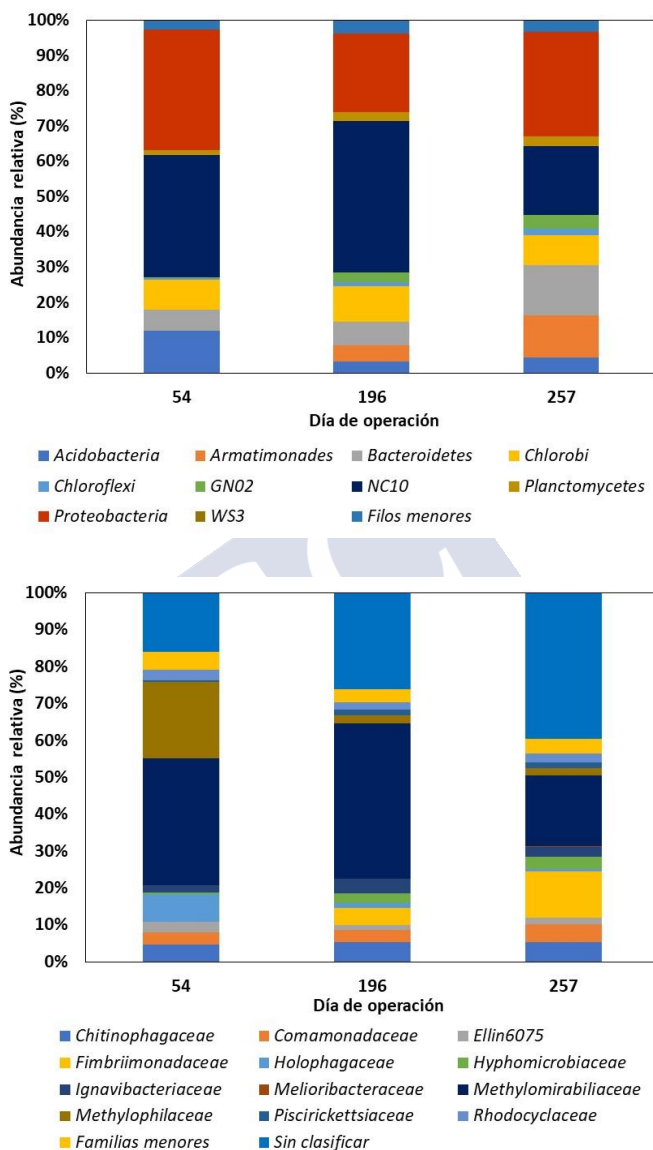


Figura 6.4. Composición de la comunidad microbiana presente en R1: Filos de bacterias (arriba) y familias de bacterias (abajo) con abundancias relativas superiores al 1%.

6.3.3 El papel de bacterias n-damo en la eliminación de OMPs

La eficacia de eliminación de los OMPs se estudió durante toda la fase de enriquecimiento correspondiente al Periodo 2, para determinar el comportamiento de los microorganismos n-damo frente a la presencia de estos compuestos. La sorción en el lodo no fue considerada como un mecanismo de eliminación relevante, dado que los compuestos estudiados no son lipofílicos, a excepción del FLX y a que la generación neta de biomasa en R1 fue inapreciable, manteniéndose la concentración de SSV durante toda la operación en unos $0,4 \text{ g SSV L}^{-1}$, apoyando la tesis de la baja contribución de la sorción como mecanismo de eliminación de los OMPs. Atendiendo a los valores publicados de los coeficientes de Henry para los OMPs seleccionados, tampoco se consideró la volatilización como mecanismo de eliminación. Por tanto, las eliminaciones obtenidas en este estudio se atribuyen a la biotransformación. Los OMPs estudiados se pueden clasificar de la siguiente forma: compuestos recalcitrantes al tratamiento aplicado (con eficiencias de eliminación menores al 20%), como TMP, CBZ, DZP, EE2, IBP y NPX; compuestos altamente biotransformables ($>90\%$), como es el caso de E1 y E2; y compuestos biotransformados de manera moderada (20-80%), como ERY, SMX, ROX y FLX.

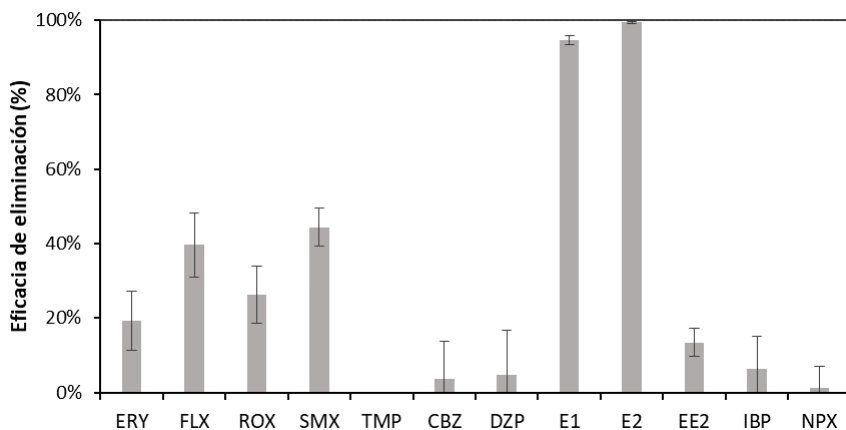


Figura 6.5. Eficacias de eliminación de OMPs observadas en el reactor R1.

Las bajas eficacia de eliminación de los compuestos CBZ y DZP se sitúan dentro de lo esperado, dado que su comportamiento se clasifica como recalcitrante en ambientes oxidación-reducción anaerobio, anóxico y aerobio, como ha sido señalado

EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE ELIMINACIÓN DE METANO DISUELTO, NITRÓGENO Y MICROCONTAMINANTES ORGÁNICOS EN CULTIVOS N-DAMO MEDIANTE BIORREACTORES DE MEMBRANAS

en estudios previos (Alvarino et al., 2018; Suarez et al., 2010). La eliminación de IBP se situó en un 15% al final de la experimentación, siendo un compuesto biodegradable en ambientes aerobios heterótrofos, cuya biodegradación se ve favorecida especialmente por el proceso de nitrificación biológica y mostrando, por el contrario, un comportamiento recalcitrante en ambientes anaerobios metanogénicos (de Graaff et al., 2011; Fernandez-Fontaina et al., 2016). De todo ello se puede extraer como conclusión que la biodegradación de IBP está altamente influenciada por las condiciones de potencial oxidación-reducción y que ambientes anaerobios impiden o limitan su biotransformación.

El comportamiento observado en las hormonas naturales E1 y E2 (eliminación casi completa) y la baja o nula eliminación de EE2, fueron similares a los señalados previamente para un sistema desnitrificante de lodos activos (Suarez et al., 2010). Como diferencia, las eliminaciones de las hormonas naturales E1 y E2 fueron superiores en este estudio.

Los compuestos ERY, ROX, SMX y FLX presentaron una biodegradabilidad comprendida entre el 40% y 70% al final de la experimentación, siendo baja a inicio. En el caso de FLX, al inicio presentó una eliminación mayor que en el resto de la operación, debido a sus propiedades lipofílicas, hasta saturarse el medio y la superficie de componentes del reactor de este compuesto. Su eliminación está atribuida al fenómeno de sorción en ambientes anóxicos (Alvarino et al., 2018); sin embargo, se señalaron altas eliminaciones de FLX en reactores desnitrificantes anóxicos con un tiempo de retención celular elevado (Suarez et al., 2010), condiciones que se dan en este estudio ya que no se purga lodo del biorreactor de membrana. En el capítulo 3 de esta tesis se señala una eficiencia de eliminación para ROX y ERY del 30% en una etapa anóxica, comparable también con la eliminación que se encontró en la etapa aerobia del mismo sistema. Sin embargo, otros autores observaron una mayor biodegradación bajo condiciones anóxicas para el compuesto ROX (Burke et al., 2014). Aunque la eliminación de SMX se asocia con condiciones anaerobias (capítulo 3 de la presente tesis; Alvarino et al., 2018), también se han obtenido eliminaciones considerables en ensayos discontinuos en condiciones desnitrificantes anóxicas (Torresi et al., 2017).

6.3.4 Biorreactor de membrana R2.

En este sistema se han podido distinguir 4 periodos diferentes de acuerdo con las estrategias de operación implementadas: Periodo 1 (días de operación 0-82), caracterizado por la pérdida de capacidad desnitrificante del sistema; Período 2, donde se estudian el impacto de una concentración moderada de oxígeno en alimentación (días de operación 83-249); Período 3 en el que se estudia el efecto de salinidades moderadas, aportando al medio una fracción de agua de mar filtrada como fuente de iones (día de operación 397-716) para estudiar su impacto en la estabilidad del proceso n-damo; y un Periodo 4 (días de operación 717-878), donde se efectúan cambios en la alimentación, adaptando la concentración de sales de P y Ca, para evitar la precipitación de fosfatos o se añade sal disódica del ácido etilen-aminotetraacético (EDTA) con el fin de incrementar la biodisponibilidad de las trazas de Fe y Cu añadidas.

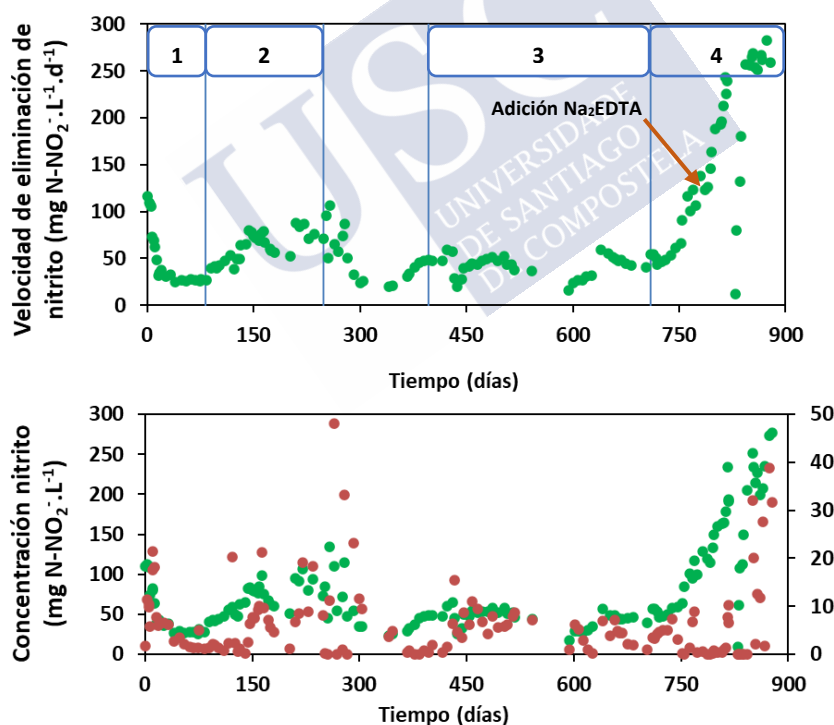


Figura 6.6. Figura superior: evolución de la velocidad de eliminación de nitrito en el biorreactor de membrana R2; Figura inferior: concentración de nitrito en alimentación, en verde en el eje principal y permeado en rojo en el eje secundario (abajo).

EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE ELIMINACIÓN DE METANO DISUELTO, NITRÓGENO Y MICROCONTAMINANTES ORGÁNICOS EN CULTIVOS N-DAMO MEDIANTE BIORREACTORES DE MEMBRANAS

El biorreactor de membrana R2 se operó en continuo durante 878 días a una temperatura de $28,2 \pm 0,8$ °C. con un caudal medio de permeado de $7,0 \pm 0,4$ L d⁻¹, siendo el tiempo de retención hidráulico de $1,0 \pm 0,1$ d⁻¹. La concentración de nitrito alimentada se varió de acuerdo con las velocidades de eliminación de nitrito observadas. Los valores de nitrito residuales alcanzaron los 39 mg NO₂⁻-N L⁻¹, sin causar inhibición del sistema por acumulación de nitrito (Figura 6.6). El pH varió entre 6,4 y 8,4, siendo su media y la desviación típica de $7,7 \pm 0,3$.

Durante los primeros 716 días de operación se obtuvieron velocidades de eliminación de nitrito comprendidas entre 16,5 y 121,3 mg NO₂⁻-N L⁻¹ d⁻¹ en el sistema R2. Se siguieron varias estrategias con el fin de aumentar la actividad del sistema no siendo posible el superar velocidades de eliminación superiores a 120 mg L⁻¹ y observándose una concentración de nitrito residual de $1,5 \pm 1,1$ mg NO₂⁻-N L⁻¹ durante los períodos de mayor estabilidad, o acumulaciones puntuales de este compuesto, con concentraciones de $10,9 \pm 5,2$ mg NO₂⁻-N L⁻¹, sobre todo en el período comprendido entre el día 144 y 279 de operación, en el que se realizaron tentativas de aumento de carga. Al inicio de la operación se observa un agotamiento del ion amonio (días 0-6) debido probablemente a la actividad de biomasa anammox que, aunque se encuentra en pequeñas cantidades, agotó dicho ion, quedando la biomasa n-damo sin fuente de nitrógeno que posibilite su crecimiento (Esclapez et al., 2014; Ma et al., 2014). Por ello se decide durante los días 12-249 realizar la adición de amonio mediante pulsos diarios, para asegurar la disponibilidad de dicho ion en los primeros instantes y permitir que se usase como fuente de nitrógeno para el crecimiento, estando disponible en el medio durante al menos 5 horas. Tras no observar cambios positivos, se decide alimentar en continuo 35 mg NH₄⁺-N L⁻¹ desde el día de operación 250 hasta el día 287, detectándose concentraciones en el efluente entre 0 y 25 mg NH₄⁺-N L⁻¹. Se observó inestabilidad en la eliminación de nitrito, con valores comprendidos entre 50 y 107 mg NO₂⁻-N L⁻¹ d⁻¹. El día 251 se vuelve a alimentar amonio por pulsos diarios en las mismas condiciones que al inicio de la operación. La velocidad de eliminación de nitrito se reduce a $27,1 \pm 5,3$ mg NO₂⁻-N L⁻¹ d⁻¹ hasta el día 370, indicando el posible desarrollo de bacterias anammox durante el aumento de amonio en la alimentación. El día de operación 542 se para el reactor (cierre de centro por periodo de vacaciones) hasta el día 591 que se vuelve a arrancar. Comprobado que el amonio no influía en esas condiciones en el crecimiento de microorganismos n-damo y para limitar la posible actividad anammox, se decide alimentar de nuevo amonio en continuo a partir del día de operación 591 y hasta el final de este experimento, fijando una concentración de 4 mg NH₄⁺-N L⁻¹ en la alimentación

Impacto de oxígeno disuelto en R2 (días de operación 83-249)

Con el fin de comprobar el impacto del oxígeno en los cultivos n-damo, se dejan de desoxigenar las bolsas de alimentación a partir del día de operación 83, siendo la concentración de oxígeno en las mismas de 9-12 mg O₂ L⁻¹, el objetivo era comprobar si trazas de este compuesto podía favorecer o no el desarrollo y estabilidad de los cultivos n-damo. Se estimó una concentración de oxígeno disuelto máxima en el licor de mezcla de 0,3 mg O₂ L⁻¹, suponiendo la desorción de oxígeno disuelto con la corriente de biogás e ignorando el potencial consumo biológico del mismo. Lo más seguro es que la concentración de este compuesto fuese muy inferior, por el probable consumo biológico de este compuesto. A partir del día 83, tras no purgar oxígeno en las bolsas de alimentación, la actividad de R2 se incrementó levemente alcanzando 44 mg NO₂⁻-N L⁻¹ d⁻¹ en los primeros 10 días, mientras que durante los 67 días previos el reactor mostrara una velocidad de eliminación de nitrito estable de 29,3 ± 3,9 mg NO₂⁻-N L⁻¹ d⁻¹.

Con esta estrategia de operación no fue posible el incrementar la actividad del reactor R2 por encima de 88 mg NO₂⁻-N L⁻¹ d⁻¹. El sistema se inhibió el día 122 al generarse vacío en la cabeza del reactor y dar lugar a la entrada no controlada de aire, lo cual aportaría oxígeno de forma incontrolada al medio. Del comportamiento del reactor se observó que el sistema alcanzó una velocidad máxima de eliminación de nitrito de 79,8 ± 7,8 mg NO₂⁻-N L⁻¹ d⁻¹, mostrando una pérdida de actividad entre los días de operación 166 y 202 debido a una nueva entrada de oxígeno al reactor el día 166, necesitando en esta ocasión un período de tiempo mayor para recuperar la actividad previa.

Debido a los resultados poco satisfactorios se decide, en el día de operación 249, parar la alimentación con oxígeno y purgar las bolsas de alimentación, tal y como se recomienda en la bibliografía (Allegue et al., 2018).

Ya fuera de este período, durante el día de operación 264 vuelve a tener lugar un episodio de inhibición por entrada de oxígeno al reactor. Estos episodios de inhibición por entradas de oxígeno en el reactor concuerdan con los resultados obtenidos en otros estudios en los que se investigaba el impacto del oxígeno sobre cultivos n-damo en ensayos a corto término, para ello, Luesken et al. (2012) realizaron una serie de ensayos discontinuos, usando botellas parcialmente llenas con un medio líquido e inoculadas con biomasa procedente de un reactor n-damo, el espacio de cabeza de las

botellas contenían una fase gas, enriquecida en metano con presencia de una cantidad de oxígeno puro comprendida entre el 2 y 8% a 30 °C (Luesken et al., 2012) observando una reducción de la actividad n-damo del 57 y 81%, respectivamente. Sin embargo, la investigación presentada en este capítulo, realizada con sistemas continuos, sugiere que la sensibilidad de las bacterias n-damo al oxígeno podría ser significativa a concentraciones de oxígeno bajas, ya que la actividad del sistema aumenta de unos 75 mg L⁻¹ d⁻¹ a 107 mg L⁻¹ d⁻¹ incremento del 45% observado, tras eliminar la presencia de oxígeno disuelto en las bolsas, durante los siguientes 10 días de operación; se debe reseñar que se ha estimado una concentración de oxígeno en fase gas, suponiendo que no se consumiese, del 0,8% muy inferior a la señalada en el estudio en discontinuo. Cabe reseñar que la presencia de oxígeno en la alimentación, en las mismas cantidades que las estudiadas en esta tesis, ha imposibilitado el desarrollo de cultivos de microorganismos n-damo, cuando no se posee biomasa con actividad reseñable en un reactor MBR análogo (Allegue et al., 2018), por lo que la presencia de este elemento se debe limitar en los arranques de los sistemas n-damo.

Período 3 (días 397-716): Impacto del efecto de la salinidad

Otra estrategia seguida para incrementar la capacidad del MBR fue aportar salinidad al sistema, para ver si tenía efecto en la actividad n-damo. Para ello, se alimentó agua de mar filtrada desde el día de operación 397 hasta el 716, con una dilución comprendida entre 1:20 y 1:100 con respecto a la alimentación. El fin es investigar la influencia de los nutrientes traza y la propia salinidad aportada por el agua de mar sobre la actividad de los microorganismos n-damo. Sin embargo, la presencia de estos iones en la concentración estudiada no mostró efecto alguno positivo o negativo sobre el comportamiento del cultivo n-damo, respecto al período anterior, por lo que se retiró el aporte de agua de mar de la alimentación a partir del día de operación 717 buscando otra estrategia para incrementar la actividad.

Cambio de la concentración de P y Ca en el medio (días de operación 762-787)

De la biomasa acumulada en el reactor, hasta 1,41 g SST L⁻¹, se había observado que tan sólo un 80% eran sólidos volátiles por lo que se presupuso la posible acumulación de precipitados. Una de las hipótesis que se barajaron para explicar tanto la imposibilidad de aumento de capacidad n-damo de los reactores, como las acumulaciones puntuales de nitrito, sin causa aparente, fue la formación de

precipitados debido al exceso de sales en el medio que impiden el crecimiento de nuevas bacterias y provocan las caídas de la actividad desnitrificante al no renovarse la población microbiana. La inestabilidad de cultivos n-damo, sin causas justificadas, ya había sido observada en el pasado por otros investigadores (Bhattacharjee et al., 2016; Kampman et al., 2014, 2012) que utilizaban el medio de cultivo propuesto por Ettwig et al. (2009). Por ello, en los días 650 y 750 se analiza la biomasa mediante un microscopio electrónico de barrido con espectroscopia de rayos-X con dispersión de energía (SEM-EDX) empleando un equipo de los servicios generales de la USC (SEM, Zeiss Fesem Ultra Plus con EDX).

De la muestra extraída en el día 650 de operación se detectó la presencia de precipitados de fósforo y calcio en el lodo biológico, por lo que el día de operación 717 se modificó el medio de alimentación, disminuyendo a la décima parte la concentración de CaCl_2 y KH_2PO_4 . El medio de Ettwig et al. (2009) empleaba concentraciones de 200 y 50 mg L^{-1} de CaCl_2 y KH_2PO_4 , respectivamente, por lo que a partir del día 717 de operación la concentración de ambos componentes se redujo a 20 y 5 mg L^{-1} . Tras realizar un segundo análisis el día de operación 750, se observa la disminución de los precipitados de fósforo y calcio, aumentando la relación SSV/SST al 87%. Los días 745, 752 y 761 se realizan re-suspensiones tanto del medio de cultivo presente como de la biopelícula, adherida a las paredes del reactor y a la membrana, observada desde antes del cambio del medio de alimentación, empleando nitrógeno gas. Como resultado del cambio del medio y de la re-suspensión de la biomasa, la actividad del reactor empieza a aumentar hasta alcanzar 137,9 $\text{mg NO}_2^- \text{-N L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ el día de operación 780. Aunque la estrategia de reducción de compuestos de P y Ca tuvo efectos positivos, la actividad se mantuvo, sin embargo, estable durante el intervalo de días de operación 762-787, con una velocidad de eliminación de nitrato de $118,1 \pm 13,2 \text{ mg NO}_2^- \text{-N L}^{-1} \text{ d}^{-1}$.

Esta estrategia de reducción de compuestos de P y Ca, evitando la precipitación de los mismos sobre el lodo biológico, ya se ensayara con éxito en nuestros laboratorios en el pasado, para un cultivo de biomasa anammox en un reactor MBR (Trigo et al., 2006) así la reducción en la concentración de calcio y fósforo en el medio, hasta 1/40 del Ca y 1/5 del P original del medio recomendado por Van de Graaf et al. (1996) para el crecimiento de bacterias anammox, se tradujo en un aumento notable la capacidad de desnitrificación. La estrategia de reducción de P y Ca utilizada en este capítulo, es justamente la opuesta a la que plantea He et al. (2016b), quienes emplearon una concentración de 300 mg L^{-1} tanto para CaCl_2 como para KH_2PO_4 en

EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE ELIMINACIÓN DE METANO DISUELTO, NITRÓGENO Y MICROCONTAMINANTES ORGÁNICOS EN CULTIVOS N-DAMO MEDIANTE BIORREACTORES DE MEMBRANAS

un reactor secuencial SBR en el que se cultivaba n-damo bacteria, observando capacidades de eliminación de nitrito de sólo $11 \text{ mg NO}_2^- \text{-N L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. La mejora observada por dichos autores, aumentando la cantidad de Ca y P, podría derivarse del aumento en la capacidad tampón del medio utilizado que les ayudaría a mantener el pH en valores neutros. Un exceso de compuestos inorgánicos en el medio de alimentación puede causar la sobresaturación de las sales en el reactor, que podría causar una excesiva precipitación de compuestos inorgánicos sobre los microorganismos, o incluso a nivel intracelular, implicando con ello la reducción de la actividad desnitrificante. Por otra parte, Versantvoort et al. (2018), durante un experimento de 6 años de duración, continuación del estudio llevado a cabo por Ettwig et al. (2009) y empleando su medio, obtuvieron unas eliminaciones de nitrito medias de unos $42 \text{ mg NO}_2^- \text{-N g}^{-1} \text{SSV d}^{-1}$, valores menores a los valores máximos obtenidos en este estudio, comprendidos entre 60 y $70 \text{ mg NO}_2^- \text{-N g}^{-1} \text{SSV d}^{-1}$.

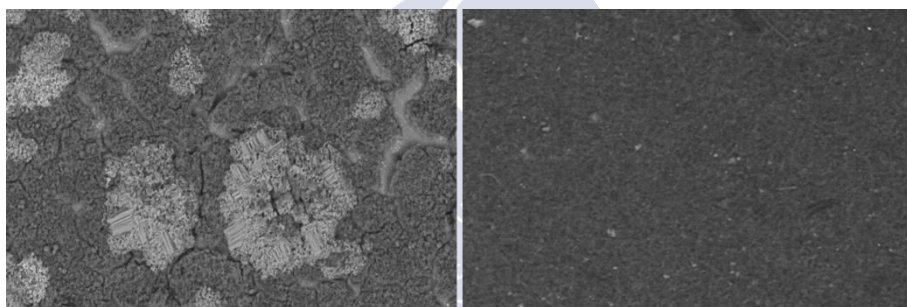


Figura 6.7. Fotografía del licor de mezcla del reactor mediante microscopía electrónica de barrido en los días de operación 650 (izquierda) y 750 (derecha).

Se debe señalar como curiosidad que a partir del día de operación 745, después de la reducción de P y Ca efectuada el día 717, no se detectó N_2O en el gas de salida del sistema, tras re-suspender la biomasa, este gas no se genera mediante el proceso n-damo, pero sí por microorganismos heterótrofos convencionales, en medios en los que se produce una fuerte limitación de fuente de carbono con una relación DQO/N baja (Desloover et al., 2012).

La estabilidad en la actividad del reactor, sin poder aumentar, indica una limitación en el sistema que impide el aumento de actividad, pero como dato positivo ya no se producen caídas en la capacidad de eliminación de nitrito, posiblemente como consecuencia de la disminución de los precipitados de fósforo y calcio que pudieron afectar a la actividad.

Impacto de la biodisponibilidad de hierro y cobre (días de operación 787-878)

Tras observar las actividades máximas y la estabilidad entre los días de operación 762 y 787, y habiendo evaluado el impacto de los macronutrientes en el medio, se decide investigar la posible ausencia o exceso de alguno de los micronutrientes contenidos en las trazas ácidas y básicas. Ello está motivado porque tanto en las bolsas de alimentación como en el preparado de trazas ácidas, se observa la aparición de un precipitado que podría afectar a la biodisponibilidad de alguno de los micronutrientes por formación de precipitados insolubles. Para ello, se procede a analizar mediante ICP-MS los elementos presentes en las trazas, previamente filtradas. La primera muestra se envió a analizar el día de operación 655, 5 días después de analizar la presencia de precipitados en el licor de mezcla por primera vez, y se repitieron los análisis los días de operación 795 y 844.

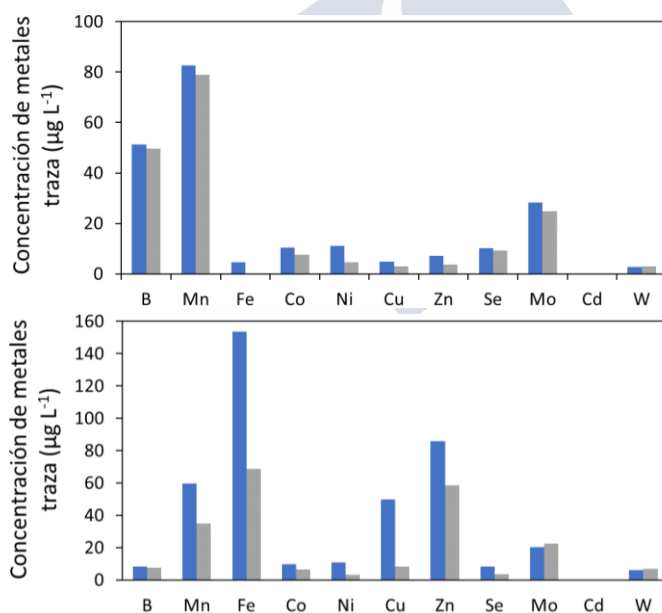


Figura 6.8. Concentración de metales disueltos en el medio de alimentación (azul) y permeado (gris) del reactor R2 en los días de operación 655, antes de la adición de Na_2EDTA (arriba), y 844 después de la adición de Na_2EDTA (abajo).

Los resultados del primer análisis mostraron que las concentraciones de hierro, cobre y zinc eran más bajas que la concentración deseada según el concentrado de las

EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE ELIMINACIÓN DE METANO DISUELTO, NITRÓGENO Y MICROCONTAMINANTES ORGÁNICOS EN CULTIVOS N-DAMO MEDIANTE BIORREACTORES DE MEMBRANAS

trazas empleadas (Tabla 6.1). La concentración en alimentación de estos elementos fue: de hierro $4,5 \mu\text{g L}^{-1}$, cobre $4,7 \mu\text{g L}^{-1}$ y zinc $7 \mu\text{g L}^{-1}$. En el permeado, y por tanto en el licor de mezcla, no se detectó hierro, mientras se observaron $3,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de cobre y $3,7 \mu\text{g L}^{-1}$ de zinc. Para aumentar la biodisponibilidad de estos tres elementos se decidió añadir sal disódica del Ácido Etilendiaminotetraacético ($\text{Na}_2\text{-AEDT}$) como agente quelante en las trazas ácidas, de forma que en la alimentación se hallase en una concentración de $1,4 \text{ mg L}^{-1}$.

El día de operación 787 se añade $\text{Na}_2\text{-AEDT}$ a las nuevas trazas ácidas. Se decide esperar a este día para comprobar el efecto de la modificación del medio mineral, sin alterar su impacto, hasta que el sistema mostró un comportamiento de estancamiento en las actividades observadas. En los días de operación 795 y 844 se comprueba el aumento de la biodisponibilidad de los 3 elementos en el medio. El día 795, la concentración en alimentación de estos elementos fue: de hierro $129,9 \mu\text{g L}^{-1}$, cobre $62,8 \mu\text{g L}^{-1}$ y zinc $79,8 \mu\text{g L}^{-1}$. En el permeado, y por tanto en el licor de mezcla, se observaron $47,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de hierro, $21,3 \mu\text{g L}^{-1}$ de cobre y $14,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de zinc. El día de operación 844 se hallaron concentraciones muy similares.

El aumento biodisponibilidad Fe y Cu añadiendo $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ provocó un aumento rápido en la actividad del reactor en cada día analizado. El día 794 la velocidad de eliminación de nitrato ya era de $146,2 \text{ mg NO}_3\text{-N L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, que aumentó hasta el día 817 con un valor de $239,8 \text{ mg NO}_3\text{-N L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Ese día se observó un color amarillento en el permeado, que se asoció al ensuciamiento de la membrana que podría haberse favorecido durante la formación de precipitados de fósforo y calcio, y por la tendencia observada en este estudio de la biomasa n-damo para crear biopelículas que podrían adherirse sobre la membrana. Por tanto, ese día se para el reactor, se extrae la membrana y se limpia, de tal forma que durante una limpieza mecánica se recupera toda la biomasa y se reintroduce al reactor rápidamente para minimizar la entrada de oxígeno. Tras limpiar la membrana y alimentar solamente la mezcla de metano y dióxido de carbono, el reactor se vuelve a poner en marcha el día 824, comenzando con concentraciones bajas de nitrato en la alimentación. Ese es el motivo de la pérdida de capacidad observada entre los días 829 y 837. El sistema aumentó su actividad hasta alcanzar una velocidad de eliminación de nitrato máxima de $282,7 \text{ mg NO}_3\text{-N L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, manteniendo una estabilidad en la eliminación de nitrato de $262,2 \pm 9,2 \text{ mg NO}_3\text{-N L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Por tanto, el aumento de biodisponibilidad de hierro y cobre supuso un aumento en la actividad del reactor, mientras que la reducción de

precipitados en el licor de mezcla podría propiciar un ambiente para la estabilidad del reactor, sin caídas significativas en la actividad.

La influencia de la composición de metales traza fue objeto de estudio por parte de otros autores. He et al. (2015) encontraron que la adición de hierro y cobre mejoraban la actividad de bacterias n-damo a concentraciones menores de $1.110 \mu\text{g L}^{-1}$ and $635 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente, pero una mayor adición de Fe y Cu no supuso una mejora de la actividad, sugiriendo la existencia de otros factores limitantes; concentraciones de Cu mayores que $1.588 \mu\text{g L}^{-1}$ inhibieron inmediatamente la actividad n-damo. Así mismo, obtuvieron que los metales traza Zn, Mo, Co, Mn y Ni no causaron impactos significantes a concentraciones comprendidas entre 0,5 y $2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$. Lu et al. (2018) también alcanzaron las actividades máximas para cultivos n-damo a concentraciones de Fe de $1.110 \mu\text{g L}^{-1}$, con una pequeña disminución a mayores concentraciones.. Jiang et al. (2018) evaluaron los efectos de Fe, Cu y Mo en un co-cultivo de bacterias n-damo y bacterias metanogénicas; los resultados mostraron que esos compuestos estimulaban no solo las velocidades de eliminación de nitrito, sino también el crecimiento bacteriano. Sin embargo, en el presente estudio las concentraciones de Fe y Cu empleadas son menores a las máximas señaladas por estos autores. Además, dado que se reportó que el Zn no influye en la mejora de actividad n-damo, el aumento de su biodisponibilidad en este estudio no se considera como una causa del aumento de actividad del sistema, atribuyéndolo a Fe y Cu.

Al igual que tras la reducción de Ca y P en el medio, tras el aumento de la biodisponibilidad de Fe y Cu no se ha vuelto a detectar N_2O en el gas. Dado que el N_2O no es un compuesto que se produzca como consecuencia del proceso n-damo, pero sí de la desnitrificación heterótrofa convencional, especialmente en presencia de algún inhibidor o limitación de fuente de carbono, se presupone que ha sido causado por microorganismos heterótrofos convencionales, a partir de productos de decaimiento procedentes de biomasa n-damo afectada por la precipitación de fosfatos. Hasta el día 787 se detectaron valores de Carbono Orgánico Disuelto (COD) en el efluente del biorreactor comprendidos entre 1 y 25 mg L^{-1} , mientras que, a partir de ese día y hasta el final de la operación, no se detectó COD, indicando que la actividad desnitrificante convencional era residual.

6.3.5 Evolución de la diversidad microbiana en R2

Se realizaron análisis metagenómicos del gen 16S rARN mediante Illumina de muestras de biomasa de los reactores para obtener información más precisa sobre la composición microbiana, en los días de operación 62, 98, 132, 180, 221, 446 y 543. Durante la experimentación no se detectó presencia de los microorganismos n-damo arquea mediante ensayos FISH, por lo que no se analizaron mediante la secuenciación de genes. La comunidad microbiana fue muy diversa taxonómicamente. Las unidades taxonómicas bacterianas (OTUs) se distribuyeron en 44 filos diferentes, de los cuales los más abundantes (tomando como referencia los mayores al 1%) representaron el $97,4\% \pm 0,9\%$ del total de OTUs pertenecientes a este nivel (Figura 6.9). El filo NC10 que está asociado a las bacterias n-damo (Ettwig et al., 2010) fue el de mayor abundancia, en torno a un 35-60%, seguido del filo *Proteobacteria*. En las muestras de los días de operación 568 y 609, la abundancia relativa de bacterias n-damo sufrió una caída hasta un 12%, espacio de tiempo en el que la actividad del sistema cae a unos $22 \text{ mg NO}_2\text{-N L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ que puede estar asociada con una caída del pH a 7,1 en el reactor, que pudo causar un impacto negativo en esta comunidad, y la consiguiente proliferación de otros microorganismos oportunistas que pudieron verse favorecidos por la presencia de ambientes más ácidos, como se observa al incrementarse la presencia de *Acidobacteria*, con más de un 50% de abundancia relativa en esa franja de tiempo. Este punto coincide también con el arranque del reactor tras 50 días parado por período vacacional, que pudo haber influido en la caída de pH.

Las especies se distribuyeron en más de 100 familias. La familia *Methyloirabilaceae*, la familia asociada al filo NC10 a la que pertenece *Candidatus Methyloirabilis oxyfera*, fue la más abundante en todas las muestras analizadas, excepto las mencionadas previamente. Se encontraron desnitrificantes convencionales heterótrofos como *Comamonaceae* o *Hyphomicrobiaceae*, también identificados por otros autores en cultivos de n-damo bacteria (Fu et al., 2017; Wang et al., 2019), observándose una abundancia relativa mayor en los días de operación 180, 221 y 446, con una abundancia de 4,73%, 4,50% y 4,31%, respectivamente. Es probable que estos organismos empleen productos de decaimiento de la biomasa para llevar a cabo el proceso de desnitrificación convencional (Allegue et al., 2018), decaimiento que podría estar propiciado por la parada del reactor durante 50 días, poniendo de manifiesto la complejidad del sistema.

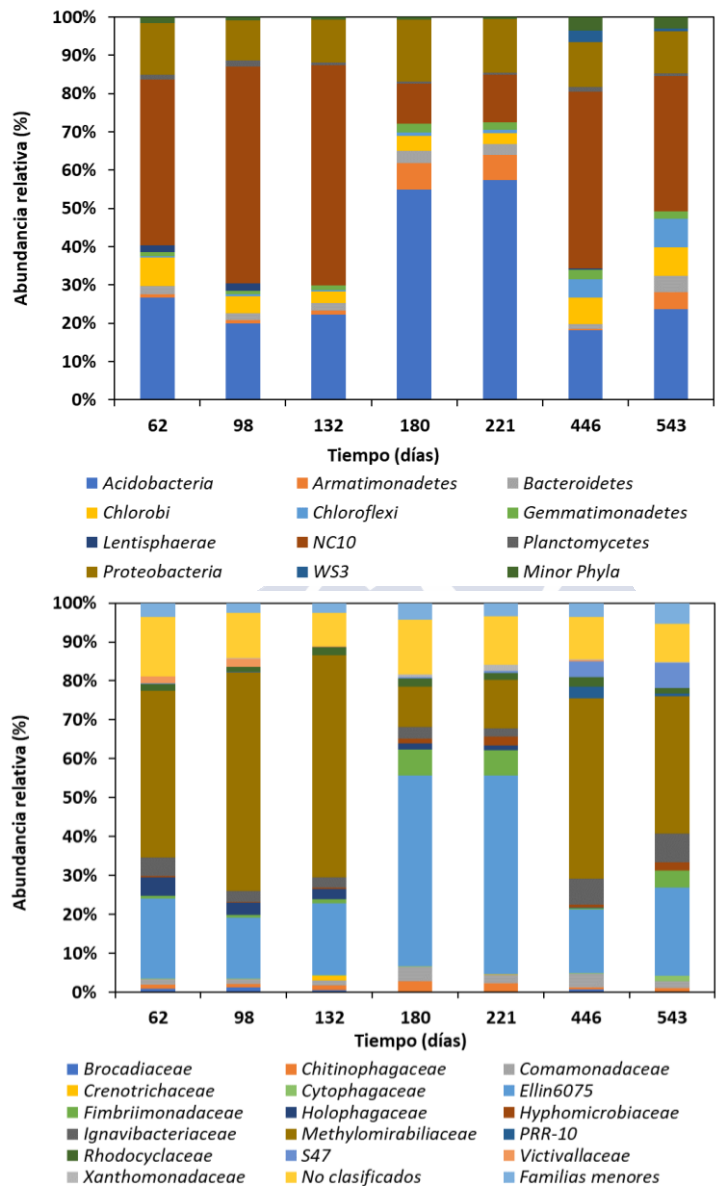


Figura 6.9. Composición de la comunidad microbiana presente en R2: Filos de bacterias (arriba) y familias de bacterias (abajo) con abundancias relativas superiores al 1%.

La presencia de metanótrofos aerobios, como la familia *Methylococcaceae*, que representaban menos del 0,07% de la comunidad durante toda la operación del reactor,

EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE ELIMINACIÓN DE METANO DISUELTO, NITRÓGENO Y MICROCONTAMINANTES ORGÁNICOS EN CULTIVOS N-DAMO MEDIANTE BIORREACTORES DE MEMBRANAS

incluso en el período 3 donde se probó el impacto del oxígeno disuelto sobre el cultivo n-damo. Del mismo modo, la adición de amonio en una concentración limitada posibilitó alcanzar el objetivo de mantener controlado el crecimiento de bacterias anammox. La familia *Brocadiaceae* representó entre el 0,5% y el 1,2% del total de la comunidad al inicio de la operación, donde se observó agotamiento de amonio durante los 6 primeros días. Tras probar la alimentación de amonio tanto por pulsos como en continuo a concentraciones de $35 \text{ mg NH}_4^+ \text{-N L}^{-1}$, desde el día 591 hasta el final de operación se alimenta amonio en continuo con una concentración de $4 \text{ mg NH}_4^+ \text{-N L}^{-1}$. Ya en la muestra del día 543 se detecta una bajada de la abundancia relativa de anammox al 0,1% sugiriendo que su presencia fue marginal a partir de ese momento. Así más, a pesar de la mayor afinidad de las bacterias anammox por nitrito con respecto a las bacterias n-damo, hace pensar que la contribución de las bacterias anammox a la desnitrificación llevada a cabo en este sistema ha sido residual.

Por tanto, se puede concluir que en el cultivo de bacterias n-damo, con abundancias relativas similares a las alcanzadas por Allegue et al. (2018), los microorganismos responsables de prácticamente la totalidad de la eliminación observada de nitrógeno fueron n-damo bacteria.

6.4 CONCLUSIONES

Este estudio proporciona una contribución significativa al desarrollo de nuevos procesos biológicos para la eliminación simultánea de metano disuelto y nitrito mediante cultivos n-damo bacteria, además de nuevos conocimientos sobre la capacidad de estos microorganismos para eliminar microcontaminantes orgánicos. El uso de un primer biorreactor permitió lograr enriquecimiento de un cultivo n-damo en un corto espacio de tiempo, alcanzando velocidades de eliminación de nitrito de $24 \text{ mg NO}_2^- \text{-N L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ en tan solo 30 días, obteniendo eficacias de eliminación elevadas para E1 y E2, mientras se observaron eficacias de eliminación moderadas para FLX, ERY, ROX y SMX.

En un segundo biorreactor de membrana se evaluó la afección del medio sobre cultivos n-damo bacteria. En una primera fase, la presencia de trazas de oxígeno, incluso a niveles bajos, parece afectar a la estabilidad del proceso y la salinidad, procedente de agua de mar, no tiene un papel ni estimulador ni inhibitorio de la actividad.

Prácticamente todos los estudios citados por la bibliografía usan el medio recomendado por Ettwig et al. (2009). Se ha encontrado que dicho medio fomenta la precipitación de precipitados de fosfatos inorgánicos sobre el lodo, disminuyendo la proporción de SSV en el lodo a 80%. Su reducción permite un rápido aumento del porcentaje de volátiles en el lodo y eliminación de los períodos en los que se pierde de forma inexplicable la actividad del sistema, eliminándose la generación de trazas de N_2O del sistema. Se recomienda por ello mantener una alimentación con una concentración CaCl_2 y KH_2PO_4 respectivamente de 20 y 5 mg L^{-1} .

El aumento biodisponibilidad Fe y Cu añadiendo $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ provocó un aumento rápido en la actividad del reactor hasta alcanzar un máximo de 282,7 $\text{mg NO}_2^- \text{-N L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, manteniendo un comportamiento estable.

6.5 BIBLIOGRAFÍA

- Allegue, T., Arias, A., Fernandez-Gonzalez, N., Omil, F., Garrido, J.M., 2018. Enrichment of nitrite-dependent anaerobic methane oxidizing bacteria in a membrane bioreactor. *Chem. Eng. J.* 347, 721–730. <https://doi.org/10.1016/J.CEJ.2018.04.134>
- Alvarino, T., Allegue, T., Fernandez-Gonzalez, N., Suarez, S., Lema, J.M., Garrido, J.M., Omil, F., 2019. Minimization of dissolved methane, nitrogen and organic micropollutants emissions of effluents from a methanogenic reactor by using a preanoxic MBR post-treatment system. *Sci. Total Environ.* 671, 165–174. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.169>
- Alvarino, T., Suarez, S., Lema, J., Omil, F., 2018. Understanding the sorption and biotransformation of organic micropollutants in innovative biological wastewater treatment technologies. *Sci. Total Environ.* <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.09.278>
- Bhattacharjee, A.S., Motlagh, A.M., Jetten, M.S.M., Goel, R., 2016. Methane dependent denitrification- from ecosystem to laboratory-scale enrichment for engineering applications. *Water Res.* 99, 244–252. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.04.070>
- Burke, V., Richter, D., Hass, U., Duennbier, U., Greskowiak, J., Massmann, G., 2014. Redox-dependent removal of 27 organic trace pollutants: Compilation of results from tank aeration experiments. *Environ. Earth Sci.* <https://doi.org/10.1007/s12665-013-2762-8>

- Cai, C., Hu, S., Guo, J., Shi, Y., Xie, G.-J., Yuan, Z., 2015. Nitrate reduction by denitrifying anaerobic methane oxidizing microorganisms can reach a practically useful rate. *Water Res.* 87, 211–217.
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.09.026>
- de Graaff, M.S., Vieno, N.M., Kujawa-Roeleveld, K., Zeeman, G., Temmink, H., Buisman, C.J.N., 2011. Fate of hormones and pharmaceuticals during combined anaerobic treatment and nitrogen removal by partial nitrification-anammox in vacuum collected black water. *Water Res.* 45, 375–383.
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.08.023>
- Desloover, J., Vlaeminck, S.E., Clauwaert, P., Verstraete, W., Boon, N., 2012. Strategies to mitigate N₂O emissions from biological nitrogen removal systems. *Curr. Opin. Biotechnol.* <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.12.030>
- Esclapez, J., Bravo-Barrales, G., Bautista, V., Pire, C., Camacho, M., Bonete, M.J., 2014. Effects of nitrogen sources on the nitrate assimilation in *Haloferax mediterranei*: growth kinetics and transcriptomic analysis. *FEMS Microbiol. Lett.* 350, 168–174. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12325>
- Ettwig, K.F., Alen, T. van, Pas-Schoonen, K.T. van de, Jetten, M.S.M., Strous, M., 2009. Enrichment and Molecular Detection of Denitrifying Methanotrophic Bacteria of the NC10 Phylum. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 3656–3662.
<https://doi.org/10.1128/AEM.00067-09>
- Ettwig, K.F., Butler, M.K., Le Paslier, D., Pelletier, E., Mangenot, S., Kuypers, M.M.M., Schreiber, F., Dutilh, B.E., Zedelius, J., de Beer, D., Gloerich, J., Wessels, H.J.C.T., van Alen, T., Luesken, F., Wu, M.L., van de Pas-Schoonen, K.T., Op den Camp, H.J.M., Janssen-Megens, E.M., Francoijs, K.-J., Stunnenberg, H., Weissenbach, J., Jetten, M.S.M., Strous, M., 2010. Nitrite-driven anaerobic methane oxidation by oxygenic bacteria. *Nature* 464, 543–8.
<https://doi.org/10.1038/nature08883>
- Fernandez-Fontaina, E., Gomes, I.B., Aga, D.S., Omil, F., Lema, J.M., Carballa, M., 2016. Biotransformation of pharmaceuticals under nitrification, nitrification and heterotrophic conditions. *Sci. Total Environ.* 541, 1439–1447.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.10.010>
- Fu, L., Ding, J., Lu, Y.-Z., Ding, Z.-W., Zeng, R.J., 2017. Nitrogen source effects on the denitrifying anaerobic methane oxidation culture and anaerobic ammonium oxidation bacteria enrichment process. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8163-2>
- He, Z., Cai, C., Wang, J., Xu, X., Zheng, P., Jetten, M.S.M., Hu, B., 2016a. A novel

- denitrifying methanotroph of the NC10 phylum and its microcolony. *Nat. Publ. Gr.* <https://doi.org/10.1038/srep32241>
- He, Z., Geng, S., Pan, Y., Cai, C., Wang, J., Wang, L., Liu, S., Zheng, P., Xu, X., Hu, B., 2015a. Improvement of the trace metal composition of medium for nitrite-dependent anaerobic methane oxidation bacteria: Iron (II) and copper (II) make a difference. *Water Res.* 85, 235–243. <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2015.08.040>
- He, Z., Geng, S., Shen, L., Lou, L., Zheng, P., Xu, X., Hu, B., 2015b. The short- and long-term effects of environmental conditions on anaerobic methane oxidation coupled to nitrite reduction. *Water Res.* 68, 554–62. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.09.055>
- He, Z., Geng, S., Wang, L., Cai, C., Wang, J., Liu, J., Zheng, P., Xu, X., Hu, B., 2016b. Improvement of mineral nutrient concentrations and pH control for the nitrite-dependent anaerobic methane oxidation process. *Sep. Purif. Technol.* 162, 148–153. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2016.02.016>
- Hu, B., He, Z., Geng, S., Cai, C., Lou, L., Zheng, P., Xu, X., 2014. Cultivation of nitrite-dependent anaerobic methane-oxidizing bacteria: Impact of reactor configuration. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 7983–7991. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5835-z>
- Hu, Z., Ru, D., Wang, Y., Zhang, J., Jiang, L., Xu, X., Nie, L., 2019. Optimization of a nitrite-dependent anaerobic methane oxidation (n-damo) process by enhancing methane availability. *Bioresour. Technol.* 275, 101–108. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2018.12.035>
- IPCC Intergovernmental Panel on Climate Change, 2013. *Climate change 2013, the Physical Science Basis.*
- Jiang, L., Hu, Z., Wang, Y., Ru, D., Li, J., Fan, J., 2018. Effect of trace elements on the development of co-cultured nitrite-dependent anaerobic methane oxidation and methanogenic bacteria consortium. *Bioresour. Technol.* 268, 190–196. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.07.139>
- Kampman, C., Hendrickx, T.L.G., Luesken, F.A., van Alen, T.A., Op den Camp, H.J.M., Jetten, M.S.M., Zeeman, G., Buisman, C.J.N., Temmink, H., 2012. Enrichment of denitrifying methanotrophic bacteria for application after direct low-temperature anaerobic sewage treatment. *J. Hazard. Mater.* 227–228, 164–171. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.05.032>

- Kampman, C., Temmink, H., Hendrickx, T.L.G., Zeeman, G., Buisman, C.J.N., 2014. Enrichment of denitrifying methanotrophic bacteria from municipal wastewater sludge in a membrane bioreactor at 20 °C. *J. Hazard. Mater.* 274, 428–435. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2014.04.031>
- Li, Y., Wang, J., Hua, M., Yao, X., Zhao, Y., Hu, J., Xi, C., Hu, B., 2020. Strategy for denitrifying anaerobic methane-oxidizing bacteria growing under the oxygen-present condition. *Sci. Total Environ.* 742, 140476. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140476>
- Lim, Z.K., Liu, T., Zheng, M., Yuan, Z., Guo, J., Hu, S., 2021. Versatility of nitrite/nitrate-dependent anaerobic methane oxidation (n-DAMO): first demonstration with real wastewater. *Water Res.* 194, 116912. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.116912>
- Liu, T., Hu, S., Guo, J., 2019. Enhancing mainstream nitrogen removal by employing nitrate/nitrite-dependent anaerobic methane oxidation processes. *Crit. Rev. Biotechnol.* <https://doi.org/10.1080/07388551.2019.1598333>
- Lu, Y.Z., Fu, L., Li, N., Ding, J., Bai, Y.N., Samaras, P., Zeng, R.J., 2018. The content of trace element iron is a key factor for competition between anaerobic ammonium oxidation and methane-dependent denitrification processes. *Chemosphere* 198, 370–376. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.01.172>
- Luesken, F.A., Wu, M.L., Op den Camp, H.J.M., Keltjens, J.T., Stunnenberg, H., Francoijs, K.J., Strous, M., Jetten, M.S.M., 2012. Effect of oxygen on the anaerobic methanotroph “*Candidatus Methylopirabilis oxyfera*”: Kinetic and transcriptional analysis. *Environ. Microbiol.* <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02682.x>
- Ma, R., Hu, Z., Zhang, J., Ma, H., Jiang, L., Ru, D., 2017. Reduction of greenhouse gases emissions during anoxic wastewater treatment by strengthening nitrite-dependent anaerobic methane oxidation process. *Bioresour. Technol.* 235, 211–218. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2017.03.094>
- Ma, S., Zhang, D., Zhang, W., Wang, Y., 2014. Ammonia stimulates growth and nitrite-oxidizing activity of *Nitrobacter winogradskyi*. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* 28, 27–32. <https://doi.org/10.1080/13102818.2014.901679>
- Nie, W.-B., Xie, G.-J., Ding, J., Lu, Y., Liu, B.-F., Xing, D.-F., Wang, Q., Han, H.-J., Yuan, Z., Ren, N.-Q., 2019. High performance nitrogen removal through integrating denitrifying anaerobic methane oxidation and Anammox: from enrichment to application. *Environ. Int.* 132, 105107.

<https://doi.org/10.1016/J.ENVINT.2019.105107>

- Noyola, A., Morgan-Sagastume, J.M., López-Hernández, J.E., 2006. Treatment of biogas produced in anaerobic reactors for domestic wastewater: Odor control and energy/resource recovery. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 5, 93–114. <https://doi.org/10.1007/s11157-005-2754-6>
- Sánchez, A., Rodríguez-Hernández, L., Buntner, D., Esteban-García, A.L., Tejero, I., Garrido, J.M., 2016. Denitrification coupled with methane oxidation in a membrane bioreactor after methanogenic pre-treatment of wastewater. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 91, 2950–2958. <https://doi.org/10.1002/jctb.4913>
- Silva-Teira, A., Sánchez, A., Buntner, D., Rodríguez-Hernández, L., Garrido, J.M., 2017a. Removal of dissolved methane and nitrogen from anaerobically treated effluents at low temperature by MBR post-treatment. *Chem. Eng. J.* 326, 970–979. <https://doi.org/10.1016/J.CEJ.2017.06.047>
- Silva-Teira, A., Sánchez, A., Buntner, D., Rodríguez-Hernández, L., Garrido, J.M., 2017b. Removal of dissolved methane and nitrogen from anaerobically treated effluents at low temperature by MBR post-treatment. *Chem. Eng. J.* <https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.06.047>
- Suarez, S., Lema, J.M., Omil, F., 2010. Removal of Pharmaceutical and Personal Care Products (PPCPs) under nitrifying and denitrifying conditions. *Water Res.* 44, 3214–3224. <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2010.02.040>
- Torresi, E., Escolà Casas, M., Polesel, F., Plósz, B.G., Christensson, M., Bester, K., 2017. Impact of external carbon dose on the removal of micropollutants using methanol and ethanol in post-denitrifying Moving Bed Biofilm Reactors. *Water Res.* 108, 95–105. <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2016.10.068>
- Trigo, C., Campos, J.L., Garrido, J.M., Méndez, R., 2006. Start-up of the Anammox process in a membrane bioreactor. *J. Biotechnol.* <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2006.05.008>
- Van De Graaf, A.A., De Bruijn, P., Robertson, L.A., Jetten, M.S.M., Kuenen, J.G., 1996. Autotrophic growth of anaerobic ammonium-oxidizing micro-organisms in a fluidized bed reactor. *Microbiology* 142, 2187–2196. <https://doi.org/10.1099/13500872-142-8-2187>
- van Kessel, M.A., Stultiens, K., Slegers, M.F., Guerrero Cruz, S., Jetten, M.S., Kartal, B., Op den Camp, H.J., 2018. Current perspectives on the application of N-damo and anammox in wastewater treatment. *Curr. Opin. Biotechnol.*

<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2018.01.031>

Versantvoort, W., Guerrero-Cruz, S., Speth, D.R., Frank, J., Gambelli, L., Cremers, G., van Alen, T., Jetten, M.S.M., Kartal, B., Op den Camp, H.J.M., Reimann, J., 2018. Comparative genomics of *Candidatus Methylomirabilis* species and description of *Ca. Methylomirabilis lanthanidiphila*. *Front. Microbiol.* 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01672>

Wang, J., Hua, M., Li, Y., Ma, F., Zheng, P., Hu, B., 2019. Achieving high nitrogen removal efficiency by optimizing nitrite-dependent anaerobic methane oxidation process with growth factors. *Water Res.* 161, 35–42. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.05.101>

Wang, Y., Wang, D., Yang, Q., Zeng, G., Li, X., 2017. Wastewater Opportunities for Denitrifying Anaerobic Methane Oxidation. *Trends Biotechnol.* 35, 799–802. <https://doi.org/10.1016/J.TIBTECH.2017.02.010>





CONCLUSIONES GENERALES

En este apartado se detallan las conclusiones principales a las que se ha llegado en esta tesis doctoral, enfocada a disminuir los principales inconvenientes, en términos de impacto ambiental, de sistemas anaerobios UASB para el tratamiento de aguas residuales de baja carga a temperatura ambiente. Entre esos impactos destacan la presencia de metano disuelto y nitrógeno en efluentes de UASB, por lo que en el desarrollo de esta tesis se fomenta el uso de metano disuelto como dador de electrones en el proceso de desnitrificación en etapas de postratamiento basadas en la tecnología SIAM. Durante los trabajos experimentales se han operado 2 postratamientos innovadores diferentes que combinan biopelículas con biomasa en suspensión: un UASB seguido de un MBR preanóxico híbrido mejorado con respecto a estudios previos, proceso SIAM, y un UASB seguido de un sistema IFAS, proceso SIAL. Además, para avanzar en el conocimiento de sistemas n-damo bacteria, se operó un MBR anóxico siguiendo diferentes estrategias para evaluar la capacidad de desnitrificación del sistema.

En el capítulo 3 se ha evaluado un sistema SIAL, empleando biopelículas para fomentar el crecimiento de microorganismos oxidadores de metano y desnitrificantes. En el sistema SIAL se obtuvieron eficacias elevadas de eliminación de DQO_T , del 93%. En cuanto al nitrógeno, éste se eliminó parcialmente, obteniendo un 33% de eliminación debido a la biopelícula presente, sin llegar a oxidar por completo el amonio. En la eliminación de nitrógeno estuvieron involucrados un consorcio de desnitrificantes heterótrofos, oxidadores de metano, y microorganismos anammox. Los metanótrofos presentes en la biomasa en suspensión y en biopelícula en los compartimentos anóxico y aerobio fueron los responsables de una reducción de hasta el 85% de metano disuelto. La biopelícula aerobia tuvo un papel importante tanto en la eliminación de metano disuelto como de nitrógeno. Debido al lavado de la biomasa en suspensión, probablemente a causa de la muy baja materia orgánica disponible (relación A/M de tan solo $0,05 \text{ g DQO g}^{-1} \text{ SSVLM d}^{-1}$), una herramienta para optimizar el sistema en términos de reducción de emisiones de metano y nitrógeno

CONCLUSIONES GENERALES

sería desarrollar y conservar una biomasa con un alto contenido en organismos metanótrofos y anammox en las biopelículas.

De cara a obtener efluentes tratados de mayor calidad, en el capítulo 4 se propone el uso de un MBR híbrido preanóxico como postratamiento para efluentes de sistemas UASB que tratan aguas residuales de baja carga, donde se use el metano disuelto en el efluente anaerobio como dador de electrones para el proceso de desnitrificación. En cuanto a la calidad del efluente del sistema SIAM, se observaron durante toda la operación eliminaciones de DQO mayores al 98%, y de amonio mayores al 95%. En el compartimento anóxico se detectaron velocidades de eliminación de metano disuelto comprendidas entre 75 y 135 mg CH₄ L⁻¹ d⁻¹, con porcentajes de eliminación de 60-80%.

El prototipo SIAM operado presentó una modificación con respecto a estudios anteriores: se separó físicamente el compartimento aerobio de la etapa de ultrafiltración, de modo que se facilitó el uso de biopelículas en la etapa aerobia con el fin de facilitar condiciones anóxicas/anaerobias y microaerobias. Este hecho permitió potenciar la eliminación de NT en el sistema SIAM, sin alterar el volumen utilizado del equipo. La eliminación de NT se incrementó gradualmente desde los 20 mg NT L⁻¹ obtenidos previamente en otros estudios, hasta aproximadamente 43 mg NT L⁻¹ sin la presencia de ion sulfuro como dador de electrones, poniendo de manifiesto la importancia de un compartimento aerobio con presencia de biopelícula. La adición de sulfuro como un dador extra de electrones no tuvo ningún impacto en la eliminación de metano disuelto ni microcontaminantes, pero la eliminación de nitrógeno se incrementó hasta 63 mg NT L⁻¹. El uso de partículas de soporte en las cámaras aerobias y anóxica, potenció el crecimiento de bacterias metanótrofas aerobias, microorganismos anammox y nitrificantes en las biopelículas, con respecto a la biomasa en suspensión. Estas poblaciones tuvieron un efecto positivo tanto en la eliminación de nitrógeno como de metano disuelto, por lo que se concluye que aporte significativo de esta tesis es la mejora del proceso SIAM mediante la modificación realizada en el diseño del MBR, mejorando el comportamiento del sistema.

Tanto en los sistemas SIAM como SIAL se observó que la eliminación de OMPs se vio favorecida por la presencia de ambientes con diferentes potenciales de oxidación-reducción. La etapa anaerobia potenció la eliminación de OMPs como los antibióticos TMP y SMX, o el antiinflamatorio NPX, alcanzando eficiencias de eliminación de OMPs elevadas (mayores al 70%) para muchos compuestos

farmacéuticos, especialmente hormonas y antibióticos, en el conjunto de los sistemas SIAM y SIAL. El lavado de biomasa en el sistema SIAL no tuvo un impacto significativo en la eliminación de OMPs, lo que demuestra el papel decisivo que tiene la biopelícula. Ambos sistemas pudieron eliminar casi por completo varios de los OMPs estudiados, aunque será necesaria una etapa posterior para eliminar la fracción remanente de aquellos que no fueron eliminados de forma biológica en el sistema, destacando el carácter recalcitrante de DZP, DCF y CBZ.

En un segundo prototipo SIAM se evaluó la viabilidad de esta tecnología para el tratamiento de aguas residuales de una industria láctea, reduciendo los costes operacionales actuales del sistema de tratamiento de las aguas residuales basado en lodos activos debido a consumo energético y generación de lodos. El sistema SIAM de dos etapas UASB y MBR mostró ser robusto a pesar de la elevada variabilidad de concentración de contaminantes, temperatura y pH que se observó en el agua residual, con valores de DQO en el efluente final inferiores a 70 mg L^{-1} , observando una limitación del potencial de producción de metano por debajo de 25°C de temperatura de operación en el UASB. El biogás producido a escala industrial podría emplearse como combustible renovable en las calderas de vapor, sustituyendo una fracción del gas natural usado actualmente, disminuyendo la huella ambiental de la factoría, jugando un papel positivo en indicadores de sostenibilidad del proceso productivo. Con un PT en alimentación al UASB mayor a 30 mg PT L^{-1} , se observó la eliminación de una fracción del fósforo en esta etapa. El postratamiento fue capaz de eliminar en torno al 25% del metano disuelto en el compartimento anóxico como resultado de la elevada presencia de materia orgánica procedente del UASB, que podría dificultar el crecimiento de microorganismos metanótrofos. Del NT presente en el efluente del UASB, el MBR fue capaz de eliminar el 70-85%, manteniendo una concentración de NT en el efluente del sistema SIAM menor a 13 mg L^{-1} durante un largo período, que podría optimizarse modificando la relación de recirculación externa en el MBR.

Si bien un aporte significativo de cara a verificar la viabilidad de la tecnología SIAM en industrias lácteas es el ahorro energético con respecto a tratamientos convencionales, otro factor positivo es la reducción de generación de lodos. La tasa global de crecimiento de la biomasa se situó en torno a $0,11 \text{ g SST g}^{-1} \text{ DQO tratada}$, siendo un valor mucho menor a los observados en plantas de tratamiento de aguas residuales basadas en sistemas de lodos activos convencionales tratando efluentes similares.

CONCLUSIONES GENERALES

De cara a minimizar el impacto ambiental de efluentes de sistemas UASB en el tratamiento de aguas residuales en términos de emisiones de metano y nitrógeno, los sistemas n-damo bacteria se plantean como una alternativa prometedora para eliminar metano y nitrógeno de forma simultánea y, además, sin generar N_2O como producto intermedio. Sin embargo, son escasos los casos de éxito de estos sistemas tratando aguas reales, y los estudios realizados en laboratorios indican que estos microorganismos presentan tiempos de duplicación elevados y actividades bajas o moderadas, con pérdidas de las mismas tras largos períodos de operación. Esta tesis proporciona una contribución reveladora para el desarrollo de procesos biológicos basados en n-damo bacteria para la eliminación simultánea de metano y nitrito, al mismo tiempo que conocimientos sobre su capacidad para eliminar OMPs. En un primer biorreactor de membrana se logró obtener un cultivo enriquecido en n-damo en poco tiempo, obteniendo velocidades de eliminación de nitrito de $24 \text{ mg NO}_2^- \text{ N L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ en tan solo 30 días. En este estudio se observaron eficacias de eliminación de OMPs elevadas para E1 y E2, mientras se eliminaron parcialmente FLX, ERY, ROX y SMX. Sin embargo, la capacidad de eliminación de nitrógeno de este biorreactor se presenta baja, por lo que resulta imprescindible incrementarla de cara a una aplicación práctica de este sistema.

Para avanzar en el conocimiento de cada a una aplicación práctica de sistemas n-damo bacteria, se evaluó la afección del medio empleado sobre cultivos n-damo bacteria en un segundo biorreactor de membrana. En una primera etapa se evaluaron dos factores: la presencia de trazas de oxígeno, que incluso a niveles bajos parece perturbar la estabilidad del proceso; y la salinidad procedente de agua de mar, que no supone un efecto ni estimulador ni inhibitorio. El medio comúnmente empleado en los estudios citados por la bibliografía es el recomendado por Ettwig et al. (2009). En este estudio se observó que dicho medio favorece la formación de precipitados de fosfatos inorgánicos sobre el lodo, disminuyendo la proporción de SSV en el lodo a 80%. La reducción de este ion permite un rápido aumento del porcentaje de SSV en el lodo y la eliminación de los episodios en los que se pierde de forma inexplicable la actividad del sistema, al mismo tiempo que deja de detectarse la generación de trazas de N_2O del sistema. Se recomienda por ello mantener una alimentación con una concentración CaCl_2 y KH_2PO_4 respectivamente de 20 y 5 mg L^{-1} . Además, se observó que la biodisponibilidad de algunos compuestos era menor a la esperada. El aumento de la biodisponibilidad de Fe y Cu añadiendo $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ provocó una subida rápida en la actividad del reactor hasta alcanzar un máximo de $282,7 \text{ mg NO}_2^- \text{ N L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, manteniendo un comportamiento estable en el tiempo.

LISTA DE PUBLICACIONES

Publicaciones en revistas científicas

- **A. Arias**, T. Alvarino, T. Allegue, S. Suárez, J.M. Garrido, F. Omil, 2018. An innovative wastewater treatment technology based on UASB and IFAS for cost-efficient macro and micropollutant removal. J. Hazard. Mater. 359, 113–120. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.07.042>. Factor de Impacto: 6.4. Categoría revista: Q1. Editorial Elsevier. Una parte del **Capítulo 3** ha sido publicado en este artículo. Contribución a la publicación: Conceptualización, Investigación, Escritura borrador original.

Permiso para uso en tesis doctoral:

<https://www.elsevier.com/about/policies/copyright/permissions>

- M. Martínez-Quintela, **A. Arias**, T. Alvarino, S. Suárez, J.M. Garrido, F. Omil, 2021. Cometabolic removal of organic micropollutants by enriched nitrite-dependent anaerobic methane oxidizing cultures. J. Hazard. Mater. 402, 123450. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123450>. Factor de Impacto: 6.4. Categoría revista: Q1. Editorial Elsevier. Una parte del **Capítulo 6** ha sido publicado en este artículo. Contribución a la publicación: Conceptualización, Investigación, Escritura borrador original; de la parte que corresponden a la contribución de la autoría de esta tesis doctoral, que es la parte de contaminantes convencionales.

Permiso para uso en tesis doctoral:

<https://www.elsevier.com/about/policies/copyright/permissions>

Comunicaciones en conferencias

- **A. Arias**, L. Rodríguez-Hernández, A. Silva-Teira, I. López, E. Iglesias, J.M. Garrido (Noviembre 2017). "Removal of dissolved methane and nitrogen in dairy industry wastewater using the SIAM process". Presentación oral. Congreso YWP España. Bilbao, España.
- **A. Arias**, A. Liñares, M. Martínez, F. Omil, J.M. Garrido (Julio 2019). "of micro and macro pollutants from anaerobically treated effluents by using MBR post-treatment in a sulfate-containing wastewater". Presentación póster. Congreso de Digestión Anaerobia AD16. Delft, Holanda.
- **A. Arias**, L. Rodríguez, A. Silva-Teira, T. Serna, E. Sánchez, P. Simón, J. Domínguez, N. Moya, Juan M. Lema, Juan M. Garrido (November 2016). "Integrated anaerobic system for wastewater reclamation at ambient temperature in European climates. Presentación oral. XXII Encontro Luso-Galego de Química. Bragança, Portugal.
- J. Domínguez, L. Rodríguez, A. Silva-Teira, A. Donoso, T. Serna, E. Sánchez, P. Simón, N. Moya, **A. Arias**, J. M. Garrido, J. M. Lema (Octubre 2018). "Treatment of dissolved methane and nitrogen from anaerobically treated sewage: the siam process". Poster presentation. DAAL XIII, Simposio de digestion anaerobia. Medellín, Colombia.
- T. Allegue, **A. Arias**, N. Fernández, and J.M. Garrido (June 2017). "Enrichment of nitrite-dependent anaerobic methane-oxidizing bacteria (n-damo) using a Membrane Bioreactor". Presentación oral. Congreso Nacional de Biotecnología (Biotec). Murcia, España.

- T. Allegue, **A. Arias**, F. Omil and J.M. Garrido (November 2016).
“Simultaneous methane and nitrogen removal in domestic sewage by using
a hybrid bioreactor”. Presentación oral. XXII Encontro Luso-Galego de
química. Bragança, Portugal.

